



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali

CdLM - Produzioni Agroalimentari e Gestione degli Agroecosistemi

Difesa biologica della rucola dalla
tracheofusariosi causata da
Fusarium oxysporum f. sp. *raphani*

RELATORI

Prof. Giovanni Vannacci

Dott.ssa Loredana Sigillo

CORRELATORE

Prof. Fernando Malorgio

CANDIDATO

Luigi De Martino

Anno Accademico 2015/2016

A Luigi

INDICE

<i>ABSTRACT</i>	4
<i>1. INTRODUZIONE</i>	5
1.1. La rucola: caratteri botanici, diffusione e analisi di mercato	5
1.2. La tracheofusariosi della rucola	8
1.3. <i>Fusarium oxysporum</i>	9
1.4. Mezzi di controllo della tracheofusariosi	11
1.5. Controllo biologico della tracheofusariosi	16
1.6. <i>Trichoderma</i> spp.	18
<i>2. SCOPO DEL LAVORO</i>	21
<i>3. MATERIALI E METODI</i>	22
3.1. Messa a punto del sistema pianta-patogeno-antagonista.....	22
3.1.1. Isolati fungini	22
3.1.2. Scelta del ceppo patogeno: test di patogenicità degli isolati di <i>F. oxysporum</i>	25
3.1.3. Scelta della varietà di <i>Diplotaxis tenuifolia</i>	26
3.1.4. Test differenziale per la determinazione della <i>formae speciales</i> di <i>F. oxysporum</i>	28
3.1.5. Scelta del substrato e concentrazione dell'inoculo patogeno	29
3.2. Selezione degli isolate benefici di <i>Trichoderma</i> spp.....	33
3.2.1. Preparazione dell'inoculo di <i>Trichoderma</i> sp. su crusca	33
3.2.2. Selezione dei 91 isolati di <i>Trichoderma</i> spp.....	34
3.2.3. Valutazione dell'attività benefica di 26 isolati di <i>Trichoderma</i> precedentemente selezionati .	35
3.2.4. Prova di antagonismo <i>in vitro</i>	36
<i>4. RISULTATI</i>	38
4.1. Messa a punto del sistema pianta-patogeno-antagonista.....	38
4.1.1. Scelta del ceppo patogeno: test di patogenicità di isolati <i>Fusarium oxysporum</i>	38
4.1.2. Scelta della varietà di <i>Diplotaxis tenuifolia</i>	38
4.1.3. Test differenziale	40
4.1.4. Scelta del substrato e della concentrazione dell'inoculo patogeno	40
4.2. Selezione degli isolati benefici di <i>Trichoderma</i> spp.	43
4.2.1. Valutazione dell'effetto benefico di 91 isolati di <i>Trichoderma</i> spp.	43
4.2.2. Saggio di 26 isolati di <i>Trichoderma</i>	47
4.2.3. Prova di inibizione <i>in vitro</i>	51
<i>5. DISCUSSIONE</i>	57
<i>6. CONCLUSIONI</i>	61
<i>7. BIBLIOGRAFIA</i>	62
Allegato 1 – P15	68
Allegato 2 – P36	69
<i>8. RINGRAZIAMENTI</i>	71

ABSTRACT

La rucola selvatica (*Diplotaxis tenuifolia* DC.) è la specie di rucola maggiormente coltivata in Italia come “ortaggio da foglia da taglio”. Negli ultimi trent'anni è passata da specie spontanea a coltura principale delle baby leaves del settore produttivo della IV gamma. Questa specie occupa circa il 50% della superficie nazionale destinata alla produzione di baby leaves, con la Campania, la Lombardia e il Veneto considerati come i principali areali di produzione in coltura protetta.

La tracheofusariosi della rucola, causata dalle *formae specialis raphani* e *conglutinans* di *Fusarium oxysporum*, è una malattia che si è sviluppata in Italia in seguito alla coltivazione intensiva in serra delle specie *Eruca vesicaria* (rucola coltivata) e *Diplotaxis tenuifolia*. Le elevate densità di semina, unitamente ai cicli produttivi ravvicinati consentono al patogeno di proliferare e diffondersi provocando danni per milioni di euro al comparto produttivo della IV gamma.

La lotta a questa malattia viene generalmente condotta attraverso l'impiego di mezzi fisici (solarizzazione) e mezzi chimici (fumigazione) e attraverso l'impiego di fungicidi. In questo contesto, la possibilità di utilizzare un approccio di tipo biologico, attraverso l'impiego di microrganismi benefici, si pone come una valida alternativa a basso impatto ambientale che risponderebbe alla crescente richiesta di prodotti alimentari di tipo biologico e a basso contenuto di residui chimici.

Scopo del presente lavoro di tesi è quello di selezionare uno o più isolati fungini appartenenti al genere *Trichoderma* in grado di contenere lo sviluppo della tracheofusariosi della rucola causata da *F. oxysporum* f. sp. *raphani*, in vista di un loro sviluppo quale principio attivo di nuovi prodotti biologici per la difesa.

Il lavoro ha previsto lo screening di 91 isolati appartenenti alla collezione fungina del Plant Pathology & Micology Lab del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali (Università di Pisa) che sono stati utilizzati come inoculanti del terreno impiegato per la coltivazione della rucola. Le prove sono state condotte in collaborazione con il CRA-SCS di Battipaglia.

La prima fase del lavoro ha permesso di ottenere l'inoculo dei 91 isolati benefici attraverso una fermentazione solida su crusca e di mettere a punto il metodo di inoculazione artificiale del patogeno. Una prima prova condotta secondo il normale protocollo di allevamento di questa coltura, ha permesso di ridurre a 26 il numero di isolati fungini potenzialmente utilizzabili come agenti di biocontrollo, con un isolato in particolare che si è distinto per la capacità di ridurre significativamente lo sviluppo della tracheofusariosi. Al termine della seconda prova, effettuata con i 26 isolati precedentemente selezionati, e condotta in condizioni ambientali differenti dalla precedente, questo stesso ceppo (T8203) ha confermato la capacità di ridurre la malattia.

Nella parte terminale del lavoro l'isolato T8203 è stato utilizzato in prove *in vitro* volte a valutare i meccanismi d'azione nei confronti del patogeno.

I dati sin qui ottenuti rappresentano un interessante e promettente punto di partenza per individuare funghi benefici da utilizzare come principio attivo di futuri biofitofarmaci da impiegare nella lotta biologica alla fusariosi della rucola.

1. INTRODUZIONE

1.1. La rucola: caratteri botanici, diffusione e analisi di mercato

La rucola, originaria del Bacino del Mediterraneo e dell'Asia occidentale, era coltivata ed apprezzata già dagli Egiziani e Romani. Attualmente le due specie più importanti in termini di consumo e diffusione dell'areale di coltivazione sono:

- *Eruca vesicaria* (L.) Cav., alla quale si attribuisce anche il nome di rucola coltivata, è una pianta annuale con una rosetta di foglie a livello del terreno, lunghe fino a 200 mm e larghe fino a 60 mm, lobi poco profondi, dentati o incisi con picciolo corto; stelo florale alto 0,70 m pubescente alla base e con foglie sessili; la fioritura avviene nel periodo primaverile-estivo con temperature elevate e fotoperiodo lungo. I fiori sono di colore giallo o bianco disposti in racemi portati da peduncoli corti e l'impollinazione è entomofila. Il frutto è una siliqua completamente glabra che porta 2-3 file di semi per un totale di 20-30 semi. Il seme ha una dimensione pari a 0,8-1,4 mm, il peso di 1000 semi varia da 1,7 a 2,0 g.

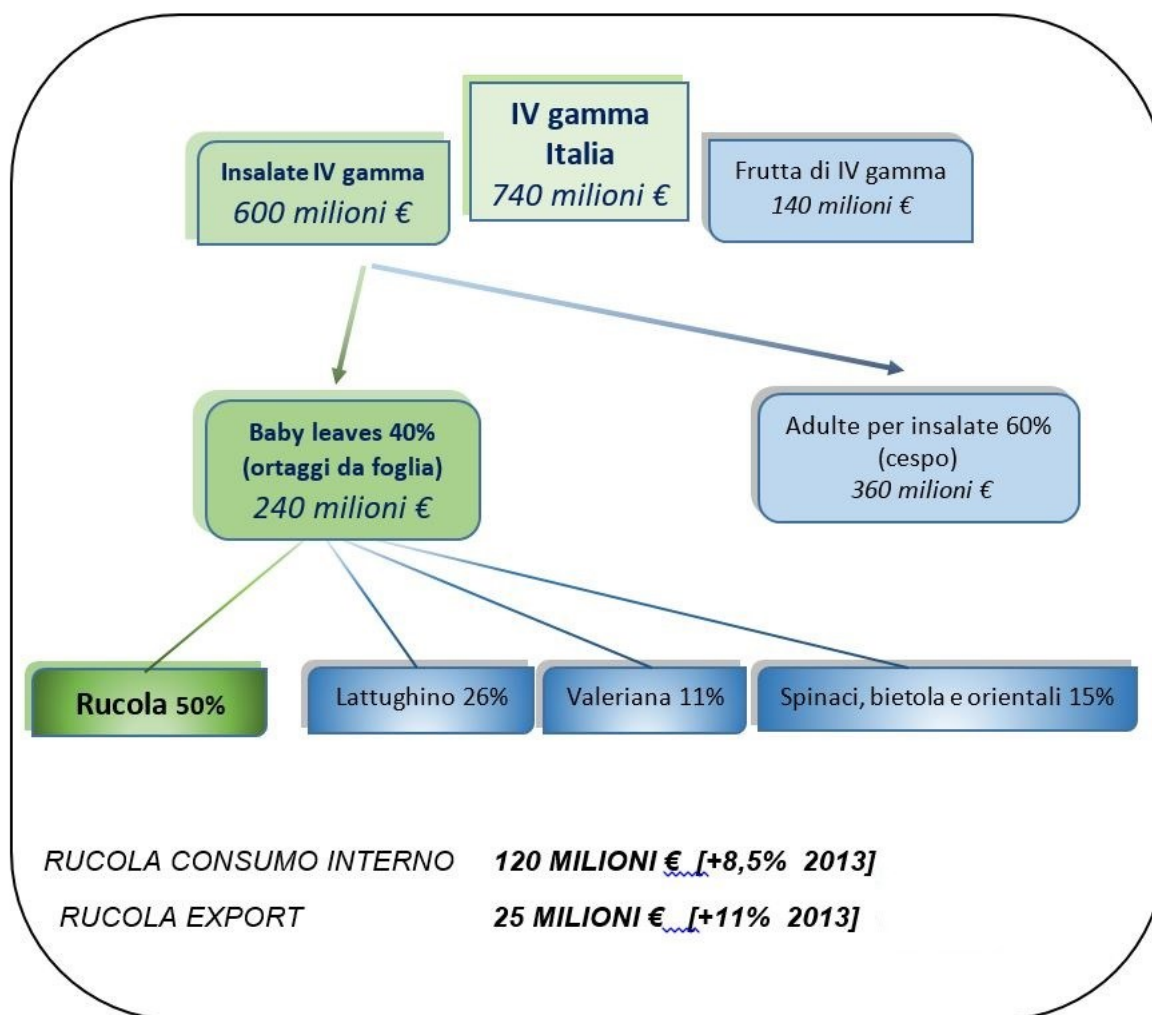
- *Diplotaxis tenuifolia* (DC.) presenta foglie con caratteristiche organolettiche analoghe a quelle dell'*Eruca*, afferisce alla specie conosciuta con il nome di rucola selvatica o ruchetta. Morfologicamente la pianta è simile alla precedente, a parte la forma delle foglie che sono più frastagliate ed hanno una lobatura primaria consistente e in alcuni casi presentano anche una lobatura secondaria. I fiori hanno petali di colore giallo; la fioritura avviene all'inizio dell'estate e si protrae fino ad autunno inoltrato. Lo stelo florale è completamente glabro e porta sulla parte apicale le silique, contenenti al loro interno circa 35-50 semi ognuna. I semi di colore bruno-arancio sono più piccoli rispetto a quelli di *Eruca*, lunghi 1,1 mm e larghi 0,6 mm.

La rucola selvatica, oggetto del presente lavoro di ricerca, è la specie maggiormente coltivata in Italia come “ortaggio da foglia da taglio”, categoria che include tutte quelle specie orticole, coltivate con densità di semina molto elevate, delle quali si consumano, come insalata, le foglie fresche raccolte giovani. Negli ultimi trent'anni la rucola è passata da specie spontanea a coltura principale delle baby leaves del settore produttivo della IV gamma (commercializzazione di preparazioni di prodotti ortofrutticoli freschi, mondati delle parti non utilizzabili, tagliati, lavati, asciugati, imballati in buste o vaschette di plastica e venduti in banco refrigerato). In Italia la coltivazione di baby leaves interessa superfici sempre maggiori ed è sostenuta da una domanda crescente di prodotti “ready to

eat” da parte dei consumatori. I principali areali di produzione della rucola in coltura protetta sono in Campania (Piana del Sele, provincia di Salerno), Lombardia (provincia di Bergamo) e Veneto. Secondo gli ultimi dati disponibili a livello nazionale (Veneto Agricoltura e Università di Padova, 2005) dei poco più di 6.500 ettari destinati alla produzione di baby leaves, in larga parte in coltura protetta, la quota maggiore spetta alla rucola selvatica - con il 50% della superficie investita a livello nazionale - seguita da lattughino (26%), valerianella (11%) e, in quote minori, dai prodotti come spinacio, bietola e orientali (vedi figura 1.1). Attualmente, si parla di oltre 3.600 ettari destinati a rucola in coltura protetta a livello nazionale, di cui 2.300 ettari in provincia di Salerno. Si tratta di dati certamente sottostimati in quanto non sono considerate le numerose superfici piuttosto modeste distribuite in più regioni. Oltre a ciò, vanno considerati la rapidità dei cicli colturali (da 4 a 6 cicli annuali) e i numerosi tagli (2-6 tagli) effettuati per ogni ciclo. Di conseguenza, le superfici dovranno essere moltiplicate per quattro o cinque volte almeno per meglio stimare le reali potenzialità produttive del comparto. La produzione dell’ortaggio (foglie) può raggiungere i 10-15.000 kg/ha di *Eruca* e 10.000 kg/ha di *Diplotaxis* per ogni taglio effettuato.

Nell'ambito dei mercati esteri, la domanda maggiore arriva da Germania e Regno Unito (considerati i paesi più esigenti in termini di qualità e controlli), seguite da Medio Oriente, Est Europa, Sud Africa e Americhe. Altro nuovo mercato al quale si sta iniziando a far conoscere la rucola è il Giappone, paese sempre attratto dalle novità e dai gusti "made in Italy".

Figura 1.1. Valore di mercato delle vendite del settore “IV gamma” suddiviso tra le colture maggiormente impiegate (fonte ANTESIA 2014).



1.2. La tracheofusariosi della rucola

Allo scopo di estenderne il loro periodo di produzione, attualmente differenti colture, tra cui la rucola, sono coltivate in serra. Produrre in strutture dove la temperatura e l'umidità dell'aria sono controllate, dove al terreno possono alternarsi differenti substrati come lana di roccia o terriccio o allestire una coltivazione in idroponica permette non solo di incrementare la produzione trasformandola in intensiva, ma di ottenere un valore aggiunto del prodotto che dovrà essere preservato per evitare perdite economiche. Per questo nelle colture protette si ha un impiego massiccio di prodotti di sintesi, non solo per tutelare il raccolto ma anche per garantire un elevato livello estetico del prodotto. La tendenza a ridurre i costi di produzione e massimizzare i profitti mediante controllo della nutrizione ha spinto le colture a superare ogni limite di crescita e produttività. Questa gestione può portare a nuovi livelli di stress per le colture e alla comparsa di malattie, a volte devastanti, come le tracheofusariosi.

La tracheofusariosi della rucola è una malattia che si è sviluppata in Italia in seguito alla coltivazione intensiva in serra delle specie *Eruca vesicaria* e *Diplotxis tenuifolia*. Dal punto di vista economico, l'agente causale *Fusarium oxysporum* è uno dei patogeni che provoca maggiori danni. Le elevate densità di semina, unitamente ai cicli produttivi ravvicinati consentono a questo patogeno di proliferare e diffondersi provocando danni per milioni di euro al comparto produttivo della rucola in particolare e della IV gamma in generale.

A partire dall'estate del 2001, fino alla primavera 2002, piante di rucola (*Eruca vesicaria* e *Diplotxis tenuifolia*) coltivate in ambiente protetto a Bergamo hanno manifestato sintomi di appassimento dovuto a questo patogeno (Catti et al., 2007), segnalato per la prima volta in Italia nel 2002 (Garibaldi et al., 2002). Una nuova epidemia è stata riscontrata nel 2003-04, espandendosi dalla Lombardia a tutto il nord Italia. Anche in Campania, primo areale di produzione per estensione, dove queste colture sono presenti da pochi anni, sono stati riscontrati i primi focolai. La malattia attribuita a *F. oxysporum* f. sp. *erucae* era stata segnalata precedentemente in India nel 1973 e 1987 (Chatterjee and Rai, 1974; Gupta, 1988). Successivamente attraverso analisi di compatibilità vegetativa (VCGs) la popolazione del patogeno è stata suddivisa in due differenti *formae speciales*, f. sp. *conglutinans* (Wollenw.) Snyder & Hanse agente causale dell'ingiallimento e dell'avvizzimento di diverse cultivar di cavolo e f. sp. *raphani* isolato per la prima volta su ravanello.

Il patogeno trova le sue condizioni ottimali di crescita laddove viene applicata la monocoltura in successione, su terreni poveri di sostanza organica, ed è stimolato dalle concimazioni azotate ammoniacali. *F. oxysporum* ff. spp. *conglutinans* e *raphani* sono trasmissibili per seme; inoltre la movimentazione di mezzi agricoli da campi infetti a campi sani e la capacità di questo patogeno di sopravvivere in assenza di ospiti preferenziali con forme di sopravvivenza (clamidospore) o infettando piante non suscettibili, ha permesso la sua rapida diffusione in areali incontaminati (Garibaldi, 2004). La malattia mostra sintomi piuttosto caratteristici ed è facilmente diagnosticabile. In attacchi precoci, dopo circa due settimane dalla semina, le giovani plantule di rucola subiscono un arresto della crescita presentando inizialmente clorosi fogliare a partire dalla zona basale, cui segue un disseccamento delle foglie clorotiche fino al collasso dell'intera pianta. In quelli tardivi provoca arresto della crescita e clorosi compromettendo, non sempre, la vita dell'ospite.

1.3. *Fusarium oxysporum*

F. oxysporum Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen è stato descritto per la prima volta dal botanico tedesco D.F.L. von Schlechtendahl nel 1824. E' la specie del genere *Fusarium* più diffusa e ubiquitaria, dal momento che riesce ad adattarsi a diverse condizioni climatiche, e può avere sia caratteristiche fitopatogene sia saprofitarie. Isolati in colture di questa specie presentano un'alta variabilità morfologica. Su PDA producono un micelio che può assumere colorazioni diverse a seconda dell'isolato preso in esame. È una specie molto rilevante dal punto di vista economico in ambito agricolo, dato l'ampio spettro di ospiti vegetali che è in grado di attaccare e le ingenti perdite che può causare quando infetta una pianta a seguito dello sviluppo della malattia nota come tracheomicosi o trachefusariosi.

F. oxysporum è un patogeno tellurico che dà origine alla malattia attraverso forme propagative da cui si sviluppano ife che attaccano l'ospite. Differenzia strutture di sopravvivenza e disseminazione attraverso le quali accresce il suo potenziale inoculativo all'interno del terreno. Alcune specie possono produrre differenti tipi di propaguli: clamidospore, macroconidi, microconidi, micelio. Le clamidospore sono forme di sopravvivenza che il fungo differenzia per sopravvivere in assenza di ospiti per lunghi periodi o in condizioni ambientali avverse. Queste strutture consentono di resistere ad elevate temperature (50°C) per tempi relativamente lunghi. I macroconidi si sviluppano coinvolgendo l'intera parete cellulare della cellula conidiogena (Marchant, 1965), viene

prodotto per la disseminazione in condizioni ottimali ma può anche germinare e dare origine a clamidospore durevoli. Questi germinano dopo 4-7 ore dalla formazione a 25-28°C producendo 1-2 tubetti germinativi. Il suo potenziale infettivo viene annullato o inibito in condizioni termiche > 35°C e con pH <3.0 e >9.0 (Griffin, 1981). I microconidi, prodotti in gran numero, sono formati da fialidi, e sono un mezzo di diffusione del patogeno molto efficace. Alla germinazione si produce un solo tubetto germinativo che possiede una capacità infettiva molto inferiore rispetto alle precedenti forme (Couteaudier and Alabouvette, 1990). Il micelio di *F. oxysporum* presente nel suolo in assenza di ospiti, differenzia velocemente clamidospore. In alcuni casi il micelio sopravvive insediandosi su ospiti come le erbe infestanti ai margini delle serre o dei campi, inoltre se insediato all'interno di un tessuto risulta molto più difficile effettuare una lotta con fumiganti al terreno (Armstrong and Armstrong, 1948; Katan, 1971).

Le specie patogene di *Fusarium* sono altamente adattate alla sopravvivenza e alla diffusione. I conidi posso trovarsi sui tegumenti dei semi con percentuali di infezione variabili dallo 0,1 al 10% e piante asintomatiche possono funzionare da serbatoi d'inoculo. Queste caratteristiche possono permettere al patogeno di percorrere grandi distanze. Un metodo di diffusione sulla breve distanza è la capacità dispersiva della malattia. *Fusarium* utilizza i venti, l'acqua d'irrigazione e la dispersione entomofila per mobilitare i conidi. La sporulazione e l'infettività sono molto influenzate dalla temperatura e dall'umidità relativa. Tra i 15 e 30°C l'aumento di sporulazione è proporzionale all'aumento di temperatura, inoltre elevate temperature potrebbero indurre fenomeni di stress della pianta ed aumentarne la suscettibilità (Katan et al., 1997). Studi condotti in campo da Matheron et al. (2005) in Arizona su *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* su lattuga hanno riportato un'incidenza della malattia dell'88% con una temperatura del suolo a 10 cm di profondità di 26°C e del 22% con una temperatura di 14°C mentre a Dicembre la soglia di malattia si è ridotta all'1%. Allo stesso modo Scott et al. (2005) hanno dimostrato come la gravità dei danni fosse massima con un regime termico giorno/notte elevato (33-26°C); moderata a 28-20°C e bassa 26-18°C. Generalmente le *formae speciales* di *F. oxysporum* sono strettamente specie specifiche, interessano solo una o alcune specie di piante della stessa famiglia o in alcuni casi solo determinate cultivar e sono indistinguibili morfologicamente. In alcuni casi possono essere attaccati ospiti non preferenziali senza induzione di gravi sintomi, questo è un meccanismo di sopravvivenza in assenza di ospiti. Ad oggi sono state identificate più di 120 *formae speciales* in base all'ospite attaccato, si passa dal tabacco e cotone al banano e al caffè fino al tulipano, gladiolo e ranuncolo.

1.4. Mezzi di controllo della tracheofusariosi

La malattia è il risultato dell'interazione tra ospite e patogeno, che interagiscono entrambi con l'ambiente. La strategia su cui si basa il controllo della malattia coinvolge le interferenze, disturbi o manipolazioni di questi componenti o delle loro interazioni con il minimo impatto sull'ambiente. Questa strategia comprende la gestione di tutte le fonti di inoculo patogene prima, durante e dopo la coltura, gestione dei residui colturali infetti, materiali di propagazione, ospiti alternativi, acque contaminate, vento, insetti, animali, macchinari, e propagazione aerea dei conidi. Le fonti esterne di inoculo sono estremamente dannose, sono in grado di infestare suoli esenti da quel patogeno. La gestione della malattia si è evoluta negli anni, in precedenza l'obiettivo era quello di eradicare il patogeno attraverso metodi chimici e colturali ignorando i possibili effetti sull'ambiente. Oggi l'importanza di tutte le interazioni che prendono parte allo sviluppo della malattia è stata compresa, l'ospite e le componenti biotiche e abiotiche di sviluppo possono essere manipolate per ridurre la malattia. L'approccio integrato sta entrando a far parte della quotidianità agricola sotto il nome di IPM (Integrated Pest Management - vedi figura 1.2) (Fry, 1982). Il controllo della malattia è più efficiente quando le pratiche e la ricerca seguono tre principi: 1) il controllo della malattia è una componente integrante della produzione dove 2) si impiega un sistema logico di tecnologie e 3) richiede una comprensione approfondita del potenziale distruttivo della malattia. L'IPM prevede delle decisioni a supporto del sistema per la selezione e l'uso di approcci per il controllo della malattia che sfociano in una strategia basata sull'analisi dei costi/benefici e che tenga conto dell'impatto sulla produzione, sulla società e sull'ambiente. L'uso di buone pratiche colturali ha dimostrato di limitare con successo la malattia e di controllarla in zone dove è esente. Queste possono agire manipolando uno o tutti e tre i componenti del triangolo della malattia (ospite, patogeno e ambiente).

Sanitizzazione: in serra è possibile gestire le fonti di inoculo patogeno (le superfici, i mezzi, le piante infette), controllare la salubrità delle piante e dei semi, sterilizzare le superfici potenzialmente infette, procedere con una disinfezione del suolo con metodi come la solarizzazione abbinata a prodotti fumiganti e la sanitizzazione delle acque d'irrigazione mediante lampade UV o clorazione.

Disinfezione delle sementi: molte specie e razze di *Fusarium* sono trasmissibili per seme. Con l'utilizzo di sementi non certificate o di varietà per cui non esiste un protocollo di analisi e disinfezione delle sementi, il rischio di introdurre un patogeno è elevato. I prodotti con cui è possibile trattare i semi sono diversi, comprendono NaHClO₂, perossido

di idrogeno, sali quaternari di ammonio e solventi miscelati con fungicidi come Benzimidazole (20g kg^{-1} di seme), Carbendazim, Mancozeb o Prochloraz. In alcuni casi è possibile sanificare i semi con trattamenti termici (56°C per 20'') come nel caso di *F. oxysporum* f. sp. *basilici* o effettuare analisi molecolari per verificare la presenza del patogeno sui lotti di seme (Manulis et al., 1999; Chiocchetti et al., 1999).

Temperatura: modificare la temperatura per diminuire o sopprimere la malattia è possibile ma non sempre applicabile. La strategia percorribile è quella di operare a basse temperature su *cultivar* termicamente poco esigenti. Infatti, varietà suscettibili di crisantemo possono manifestare sintomi lievi o essere asintomatiche con temperature inferiori a 22°C mentre su *cultivar* mediamente sensibili si riscontrano i primi sintomi a temperature superiori ai 28°C . A temperature elevate, superiori a 30°C , è possibile devitalizzare i conidi di molte specie di *Fusarium oxysporum* ma al tempo stesso questa è fonte di stress per le colture che andrebbero in contro a cali produttivi consistenti (Gardiner et al., 1987).

Fertilizzazione: l'apporto di nutrienti soprattutto in serra è un'opportunità per influenzare lo sviluppo della malattia. Azoto, calcio, cloro, ferro, manganese e zinco sono gli elementi principali che possono influenzare lo sviluppo di una malattia (Datnoff et al., 2007). Su ciclamino inoculato con *F. oxysporum*, l'apporto di azoto e calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) sopprime la malattia, mentre l'impiego di azoto nitrico e ammoniacale (NH_4NO_3) non sopprime il patogeno (Woltz & Engelhard, 1972; Engelhard, 1975, 1979). Il calcio è presente solo per lo 0,5% nelle piante ma l'aumento del suo contenuto nei tessuti e nella soluzione circolante limita fortemente il potenziale infettivo di *F. oxysporum* (Jones and Wolts, 1969). I meccanismi di azione del cloro nel contenimento della fusariosi sono ancora poco chiari. In alcuni esperimenti condotti su ciclamino inoculato con *Fusarium*, l'apporto di NaCl a tre diverse concentrazioni (0,25, 0,5 e $1,0\text{ g l}^{-1}$) ha evidenziato livelli decrescenti di malattia proporzionali all'aumento del cloro (Elmer, 2002a). I micronutrienti possono favorire il patogeno e di conseguenza l'insorgere della malattia oppure sfavorirlo. Entrano a far parte di molti enzimi o composti che svolgono funzioni metaboliche della pianta, possono quindi entrar a far parte di meccanismi di difesa che la pianta mette in atto verso il patogeno. L'impiego di silicio su melone aumenta le difese nei confronti della trachofusariosi delle cucurbitaceae.

Gestione dell'acqua d'irrigazione: l'impiego di acque contaminate, come nel caso del riciclo di soluzioni nutritive nelle colture fuori suolo, può portare all'introduzione e alla diffusione del patogeno. Oggi è possibile abbattere questa fonte di inoculo attraverso

l'installazione di lampade UV, filtri a membrana, trattamenti termici delle acque d'irrigazione o con la filtrazione lenta con sabbia. Anche l'impiego di sostanze chimiche viene tenuto in considerazione (clorazione delle acque).

Innesto: *F. oxysporum* comprende circa 120 *formae speciales* che si differenziano per attaccare un numero ristretto di ospiti della stessa specie o addirittura specifiche *cultivar*. Sfruttando questo limite, è possibile utilizzare portainnesti resistenti al patogeno che siano compatibili con la coltura. L'innesto intraspecifico sfrutta ipobionti resistenti come portainnesto, che rallentano la colonizzazione dei tessuti da parte del patogeno riducendo l'impatto della malattia sulla coltura (Cohen et al. 2002). La risultante resistenza non è data solo dal portainnesto ma dalla somma dei meccanismi di resistenza attuati dal primo e dal nesto soprastante. L'innesto interspecifico, invece, utilizza specie vicine ma differenti, con la giusta affinità tra portainnesto e nesto per consentirne lo sviluppo e la produzione. Ovviamente la resistenza al patogeno può essere molto maggiore (Edelstein et al., 1999; Edelstein et al., 2005; Traka –Mavrona et al., 2000; Cohen et al., 2002). In tutti i casi l'innesto è una pratica largamente utilizzata per la sua economicità e per gli ottimi risultati riportati.

Disinfezione del suolo: la prima applicazione di disinfezione del suolo venne introdotta, in Francia, alla fine del diciannovesimo secolo per la lotta alla Fillossera attraverso l'impiego di disolfuro di carbonio (CS₂) seguito dall'impiego del vapore per poi arrivare dopo cento anni all'utilizzo della solarizzazione. L'obiettivo della disinfezione è quello di eliminare i patogeni tellurici riducendo al minimo le interferenze con l'equilibrio biologico del terreno e il minimo effetto sulle sue proprietà chimico-fisiche. Quando si parla di disinfezione del suolo bisogna menzionare l'utilizzo del bromuro di metile che in Italia fino al 2010 (data di ritiro dal mercato) ha dato ottimi risultati per il controllo dei patogeni tellurici. Altri fumiganti utilizzati sono: Cloropicrina per il controllo di funghi, insetti e una leggera azione biocida nei confronti delle infestanti; 1,3-D usato prevalentemente come nematocida; Metil-isotiocianato (dazomet, metam sodio e metam potassio) impiegato contro artropodi, funghi (l'azione contro Fusariosi è variabile), infestanti e nematodi; Ioduro di metile, Formaldeide e Dimetil-disulfide. La combinazione di più fumiganti esplica una maggiore azione contro i patogeni, anche quelli più ostici come alcune *formae speciales* di *Fusarium oxysporum*. Utilizzare metodi fisici come il vapore, l'acqua calda e la solarizzazione permette di controllare soprattutto nel breve periodo l'impatto dei patogeni tellurici. La solarizzazione ad esempio è una pratica dipendente dalle condizioni climatiche in quanto consiste nella copertura del

terreno con film plastico per 4-6 settimane (minimo); sfrutta l'aumento della temperatura in un profilo di terreno di circa 30 cm riducendo le riserve di inoculo patogeno ma non ha lo stesso effetto su tutti i patogeni. Infatti è un metodo che viene quasi sempre associato all'utilizzo di basse dosi di fumiganti. Nella gestione integrata, la solarizzazione è associata all'apporto di sostanza organica come il sovescio di crucifere. Questo consente di sfruttare l'azione di molecole come gli isotiocianati che, uniti alle forti escursioni termiche giorno/notte, possono abbattere considerevolmente l'inoculo patogeno presente.

Resistenza genetica: la resistenza si divide in verticale e orizzontale. La prima è efficace verso un patogeno specifico ed è regolata da un singolo gene mentre la resistenza orizzontale provvede alla protezione da tutte le razze di quel patogeno in modo più o meno efficace. Il mondo scientifico punta molto all'introduzione di resistenza verticale nelle nuove varietà selezionate; ma attribuendo ogni risposta di difesa ad un pool molto ristretto di geni si rischia di esporre le colture ad attacchi da parte di patogeni differenti.

Induzione di resistenza: l'induzione di resistenza può essere divisa in due tipi: *resistenza sistemica acquisita* (SAR) e *resistenza sistemica indotta* (ISR). Nella prima la pianta sviluppa una resistenza sistemica ad un patogeno in seguito di un'infezione localizzata. La SAR è associata all'aumento dei livelli di acido salicilico (SA) a livello locale e sistemico con l'espressione coordinata di un set di geni codificanti proteine di resistenza al patogeno. L'espressione dei geni e lo sviluppo di SAR dipende dalla trasduzione del segnale indotto dall'aumento dei livelli di SA e questo a sua volta dipende dalla regolazione delle proteine di resistenza. L'ISR, invece, dipende dalla colonizzazione dell'apparato radicale da parte di organismi simbiotici (rizobatteri e funghi) promotori di crescita e agenti di biocontrollo ed è mediata dall'acido jasmonico (JA) e dall'etilene (ET). Osservando le risposte fenotipiche, ISR e SAR sono simili, agiscono in modo non specifico verso patogeni tassonomicamente differenti e sono associate all'accumulo di proteine di resistenza e fitoalessine e alla modificazione della composizione della parete cellulare (Pieterse and Van Loon, 2007). Trovano sempre maggiore impiego molecole che mimano la naturale induzione di resistenza sviluppata dalla pianta, gli elicitori. Uno di questi è il chitosano, un derivato deacetilato della chitina, componente di parete di molti funghi filamentosi (Walters et al., 2005). Studi sull'interazione tra pomodoro e *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* hanno dimostrato che l'applicazione fogliare di chitosani riduce l'infezione radicale attraverso l'incremento della formazione di barriere fisiche a livello dei tessuti radicali (Benhamou and Theriault, 1992). Trattamenti su semi di grano hanno stimolato la germinazione e il vigore controllando le infezioni da seme di

F. graminearum attraverso l'accumulo di fenoli e lignina nelle prime foglie vere (Reddy et al., 1999). Anche l'impiego di molecole come l'acido salicilico (SA) e BABA (acido β -amminobutirrico) portano all'induzione di resistenza nelle piante.

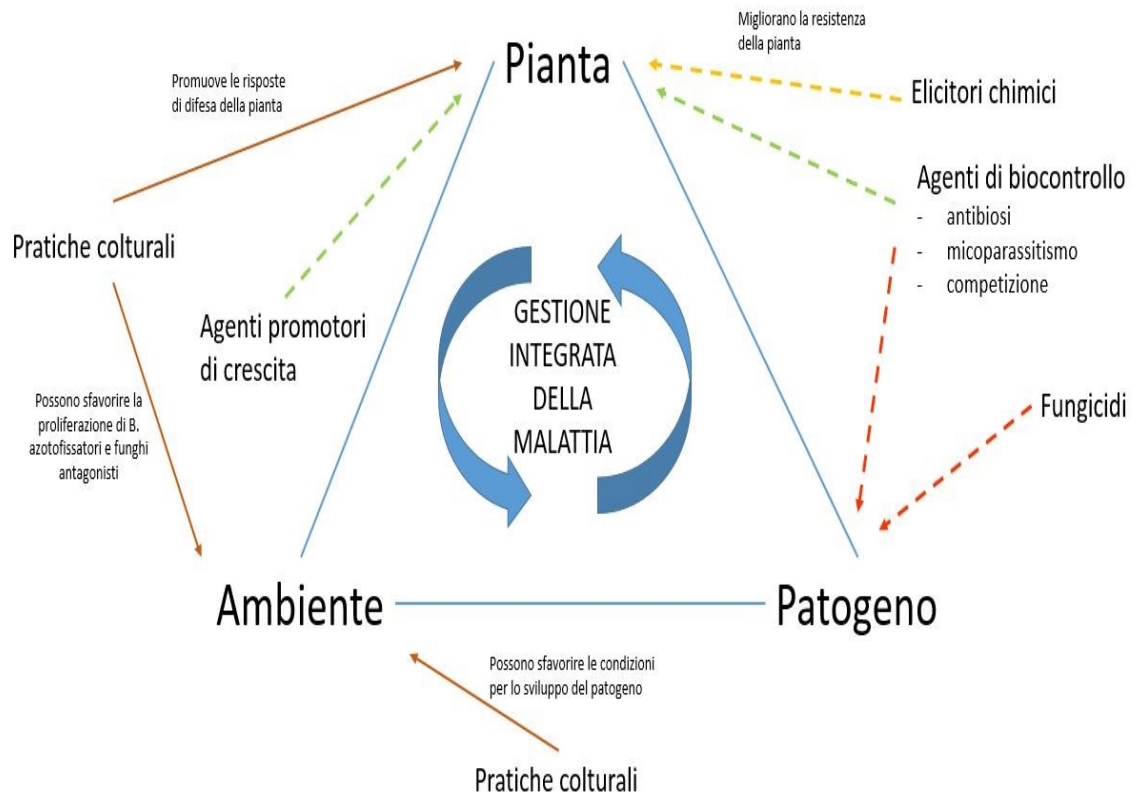


Figura 1.2. Interazione tra elicitori chimici e microbici con altre misure di controllo della malattia in un sistema di controllo integrato della malattia (basato su Walters et al., 2007).

1.5. Controllo biologico della tracheofusariosi

L'efficacia di metodi chimici per il controllo delle malattie e in particolare della tracheofusariosi risulta difficile sia per le metodologie applicative che per i risultati ottenuti. Infatti è sempre più comune lo sviluppo di forme di resistenza a principi attivi di fungicidi da parte di molti funghi patogeni. Inoltre, l'utilizzo di sistemi chimici può causare perdite nella qualità dei prodotti agricoli trattati. Per tali ragioni, si rende necessario l'impiego di altri sistemi in grado di garantire un maggior successo nella lotta agli agenti patogeni. A tale scopo alcuni microrganismi possono giocare un ruolo importante, venendo impiegati come agenti di biocontrollo. Infatti il controllo biologico utilizzato come unico metodo di lotta o all'interno di un sistema di lotta integrata, appare essere la strategia vincente per il futuro, al fine di sviluppare un'agricoltura tesa al rispetto della natura e dell'uomo. Questa strategia risponde alla richiesta sempre più crescente di ridurre l'impiego di prodotti di sintesi, come imposto dalla recente direttiva comunitaria (2009/128/CE) in cui vengono definite le misure per un uso sostenibile dei prodotti fitosanitari al fine di ridurre i rischi sulla salute umana, sull'ambiente e sulla biodiversità, promuovendo l'applicazione di metodi non chimici.

Il termine biocontrollo, in patologia vegetale, si riferisce all'uso di antagonisti microbici per ridurre la malattia e la diffusione del patogeno. L'organismo che è in grado di ostacolare la diffusione del patogeno è noto come agente di biocontrollo. Le strategie di controllo biologico dei patogeni delle piante possono essere raggruppate in tre categorie sulla base del sistema impiegato o dell'effetto prodotto: a) riduzione dell'inoculo del patogeno da parte dell'antagonista; b) protezione della pianta ospite con un antagonista del patogeno; c) impiego di isolati non virulenti del patogeno. Un microrganismo antagonista può agire in qualità di agente di biocontrollo mediante uno o più meccanismi di azione. Tra gli agenti di biocontrollo alcuni isolati fungini a carattere saprofito-simbiontico hanno riscosso un notevole successo per i loro effetti positivi. Questi ultimi sono organismi benefici che riducono gli effetti negativi provocati dal patogeno sulla pianta e producono risposte positive nella pianta stessa (Shoresh et al., 2010). Uno dei meccanismi di azione dei potenziali agenti di lotta biologica si basa sul micoparassitismo. Si tratta di un processo complesso che comprende una sequenza di eventi, cioè riconoscimento, attacco e successiva penetrazione e uccisione dell'ospite. Questi eventi si verificano in seguito alla produzione di chitinasi e altri enzimi degradatori e cambiamenti morfologici, come la formazione di coilings, che servono a penetrare le ife dell'ospite e contengono alte concentrazioni di soluti osmotici come il glicerolo (Benítez

et al., 2004). L'antagonismo microbico si può realizzare anche mediante altri meccanismi quali la competizione, l'antibiosi e l'induzione di resistenza. La competizione si ha quando due specie viventi consumano la stessa risorsa che è presente in quantità limitata. Si può verificare competizione per lo spazio, per le sostanze nutritive, per l'ossigeno, etc. L'antagonista dimostra la capacità di adattarsi molto bene all'ambiente e di colonizzare rapidamente un substrato che viene così sottratto al patogeno. Sono stati eseguiti numerosi studi *in vitro* e *in vivo* sulle capacità di colonizzazione di un substrato da parte di antagonisti, e si è visto che il loro rapido sviluppo su tale substrato rende difficile una successiva colonizzazione di esso da parte dei patogeni. L'antibiosi si ha quando un microrganismo produce una o più sostanze tossiche che inibiscono lo sviluppo e provocano la morte di altre forme di vita nelle immediate vicinanze dell'organismo che le produce. Nel caso dei funghi è l'antagonista a produrre queste sostanze tossiche ed è il patogeno a subirne gli effetti negativi. Infine, la resistenza ai patogeni può essere indotta da microrganismi associati alla pianta che colonizzandone l'apparato radicale come endofiti, scatenano una cascata di risposte nella pianta che si traduce nell'espressione di geni associati alla resistenza nei confronti dei patogeni.

Alcuni esperimenti riportano i risultati di un saggio dei ceppi batterici *Achromobacter xylosoxydans* AM1 e *Serratia* sp. DM1 isolati da suoli soppressivi per *F. oxysporum* e substrati di lana di roccia (*Pseudomonas putida* FC6B, *Pseudomonas* sp. FC7B, *Pseudomonas putida* FC8B, *Pseudomonas* sp. FC9B and *Pseudomonas* sp. FC24B) e l'applicazione di due prodotti commerciali (RootShield—*Trichoderma harzianum* T22; Cedomon—*Pseudomonas chlororaphis* MA342) impiegati contro *F. oxysporum* su rucola causato dalle ff. spp. *raphani* e *conglutinans*. I dati raccolti evidenziano una bassa incidenza della malattia (16,7%) osservata nelle applicazioni di *Achromobacter* sp. AM1, *Serratia* sp. DM1 a 10^8 CFU ml⁻¹ e *Pseudomonas* sp. FC9B a 10^7 cfu ml⁻¹ contro *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*. La biomassa maggiore (5,0 g/pianta) è stata registrata con *Serratia* sp. DM1 a 10^8 cfu ml⁻¹. Nella prova contro *F. oxysporum* f. sp. *raphani* l'applicazione di *Pseudomonas* sp. FC7B, *P. putida* FC8B a 10^8 cfu ml⁻¹ e *P. chlororaphis* MA342 a 7.5×10^6 cfu ml⁻¹ ha ridotto l'incidenza della malattia dell'87% - 92%. La biomassa maggiore (da 3,9 a 4,2 g/pianta) è stata registrata con l'applicazione di *Achromobacter* sp. AM1 e *P. putida* FC6B a 10^7 cfu ml⁻¹ (Srinivasan et al., 2009).

Duijff et al. (1993) hanno dimostrato come l'utilizzo di *Pseudomonas* fluorescenti sp. con *F. oxysporum* non patogeni possa creare un effetto sinergico nel controllo di *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* attraverso la competizione nutritiva per carbonio e ferro nei confronti del patogeno.

La combinazione di specifici ceppi di microrganismi può moltiplicare i risultati di antagonismo verso il patogeno aumentando considerevolmente i livelli di protezione e di sviluppo della coltura. Una positiva e possibile sinergia è quella ottenuta abbinando *Trichoderma* spp. e batteri antagonisti come *Pseudomonas syringae* nella lotta combinata ai patogeni delle piante (Whipps, 1997).

Il ceppo batterico *Pantoea agglomerans* Z01 noto come agente di biocontrollo è stato testato nei confronti di *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* su rucola selvatica. Sospensione dell'antagonista 10^8 , 10^7 and 10^6 cfu ml⁻¹ inoculato attraverso bagni radicali sull'ospite ha determinato un'incidenza della malattia di 23.5 %, 28.5 % e 60.0 %, rispettivamente. L'incidenza di malattia su rucola trattata con il fungicida carbendazim è stata del 22,5% mentre nel controllo positivo è stata del 82,0%. In assenza del patogeno (controllo negativo) la biomassa prodotta è stata di 10,7g/4 piante mentre in presenza dell'antagonista a concentrazione di 10^8 e 10^7 cfu ml⁻¹ si è ottenuto un aumento di biomassa del 40,9% e 39,1% rispettivamente. Questo suggerisce che il ceppo Z01 possiede non solo un'azione di controllo in quanto antagonista ma anche come promotore di crescita su rucola (Liu et al., 2014).

1.6. *Trichoderma* spp.

I funghi appartenenti al genere *Trichoderma* sono normalmente classificati come funghi imperfetti, in ragione del fatto che non è nota la forma sessuata per la maggior parte delle specie. La loro forma perfetta è rara da trovare in natura ed appartiene al genere *Hypocrea* (ordine *Hypocreales*, divisione *Ascomycota*).

Questo genere include numerosi isolati che hanno dimostrato un'elevata efficacia di azione antagonista nei confronti di molti funghi patogeni e per questo vengono utilizzati come agenti di lotta biologica. *Trichoderma* spp. è largamente distribuito in tutte le aree geografiche: diverse specie sono abbondanti in tutti i tipi di suolo, soprattutto quelli ricchi di sostanza organica e tipici di zone a clima fresco o umido. La loro attività antagonista è stata dimostrata sia *in vitro* che *in vivo*. Il successo dell'utilizzo di *Trichoderma* spp. come agenti di biocontrollo è imputabile ad una forte capacità competitiva, dovuta a diversi fattori, come la capacità di utilizzare il carbonio e l'azoto presente in diversi substrati,

alcuni dei quali non utilizzabili da altri funghi; la rapidità di sviluppo; l'adattabilità ad un ampio range di temperature; la forte attività saprofitaria; l'enorme produzione di conidi. *Trichoderma* spp. agisce utilizzando tutti i meccanismi d'azione noti, nella maggior parte dei casi più di uno. Per quanto riguarda il micoparassitismo e la produzione di enzimi litici, è stato osservato che le ife del patogeno, quando vengono circondate da quelle di *Trichoderma* spp., vanno incontro a una forte vacuolizzazione, collassano e si disintegrano. La lisi della parete cellulare dell'ospite è dovuta alla produzione di glucanasi, chitinasi e cellulasi. Questi enzimi agiscono attaccando i polisaccaridi, la chitina e i glucani che sono responsabili della rigidità della parete cellulare del fungo, distruggendone così l'integrità (Howell, 2003). Il meccanismo d'azione è articolato in fasi successive: inizialmente le ife di *Trichoderma* hanno un accrescimento chemiotropico verso quelle del patogeno, probabilmente per effetto di essudati prodotti dall'ospite; successivamente avviene il contatto ifale tra i due funghi, mediato da meccanismi di riconoscimento specifici; molto spesso l'antagonista sviluppa degli appressori che gli permettono di aderire meglio all'ifa del patogeno; infine le ife di *Trichoderma* si avvolgono attorno a quelle del patogeno, con formazione di coilings, determinandone la morte. Inoltre, diversi studi *in vitro* hanno rilevato che, ad esempio, *T. viride* e *T. harzianum*, producono sostanze volatili e non volatili capaci di inibire lo sviluppo miceliare di importanti patogeni appartenenti ai generi *Rhizoctonia* e *Fusarium*.

Infine è nota la capacità di isolati di *Trichoderma* di agire come induttori di resistenza e promotori della crescita delle piante il che ha portato alla definizione di questi funghi come microrganismi benefici (Harman, 2011). Possono controllare la malattia e dare anche altri benefit, incluso migliorare la risposta a determinati stress abiotici ed aumentare l'efficienza fotosintetica. Infine alcuni funghi possono incrementare l'efficienza di utilizzo dell'azoto da parte della pianta. Di conseguenza le piante trattate con funghi benefici possono essere più sane e robuste di piante non trattate. Recenti ricerche indicano la capacità dei funghi antagonisti di riprogrammare l'espressione genica delle piante come azione principale di controllo del patogeno (ISR-induzione di resistenza sistemica). La riprogrammazione genetica può indurre meccanismi nelle piante che allevino gli stress fisiologici e biologici o addirittura incrementare l'efficienza d'uso dell'azoto.

Molti *Trichoderma* che colonizzano le radici delle piante formano appressori finalizzati alla penetrazione ed ancoramento del fungo sull'ospite. Si tratta di funghi che crescono negli spazi intercellulari a livello dell'epidermide e della corteccia radicale, questo induce

come risposta nella pianta la produzione e deposizione di composti fenolici nei siti di penetrazione per contrastare la penetrazione nei suoi tessuti (Yedidia & Benhamou, 1999). Molte altre sono le molecole coinvolte nel rapporto fungo benefico – pianta, tra cui β -glucosidasi e acido salicilico (Sherameti, Tripathi, et al. 2008; Sherameti, Venus, et al. 2008; Stein et al. 2008). La presenza di *Trichoderma* all'interno dei tessuti può indurre un accrescimento dell'apparato radicale della pianta che le permette di incrementare la superficie di terreno esplorato e la quantità di macro e microelementi captati attraverso le ife del simbionte. *Trichoderma* spp. viene definito un simbionte opportunistico in quanto capace di vivere liberamente nel terreno in assenza di ospite.

Proteine prodotte da *Trichoderma* sono xylanasi, cellulasi ed endochitinasi, un'altra serie di proteine che induce meccanismi di difesa nelle piante sono prodotte da avirulence-like gene (Lotan & Fluhr, 1990; Martinez, 2001; Woo et al., 2006). Un'altra classe attiva di composti sono i peptidi (molecole lineari a corta catena) e alcuni oligosaccaridi che sono rilasciati dal fungo (Chutrakul et al., 2008; Chugh & Wallace, 2001; Rebuffat et al., 2000) o dalla degradazione della parete cellulare della pianta in seguito all'azione enzimatica del fungo stesso. Alcuni agenti di biocontrollo inducono la pianta a deporre lignina nei siti di possibile attacco da parte di patogeni o ancora generare specie reattive dell'ossigeno (Koike et al., 2001). L'utilizzo di *Trichoderma* nel biocontrollo ai patogeni permette di sfruttare la risposta sistemica della pianta in modo che agisca anche su insetti fitofagi. Un esempio è la produzione di Jasmonato/Etilene (Shoresh et al., 2005) o la capacità di predare nematodi come *Trichoderma harzianum* contro *Meloidogyne javanica*.

Molte specie di *Trichoderma* riescono a indurre resistenza agli stress abiotici (Qi & Zhao, 2013). È stato dimostrato che la germinazione di semi trattati con funghi benefici è migliore e la crescita delle piante in condizioni non idonee è maggiore, le colture riescono meglio a far fronte alla carenza idrica, le foglie hanno una maggiore efficienza fotosintetica e il contenuto di fotosintetati è maggiore con un riscontro positivo sulla produzione (Fiorini et al., 2015). Un'azione importante è l'induzione di resistenza in presenza di stress salino (Shabala & Cuin, 2008); la presenza di elevate concentrazioni di sali provoca un'alterazione della dislocazione dell'acqua nei tessuti, sbilanciamento degli ioni e fenomeni ossidativi. Il trattamento con agenti promotori della crescita non solo controlla e migliora questi aspetti ma favorisce l'uptake di potassio in condizioni di elevata salinità quando normalmente l'adsorbimento da parte della pianta è sfavorito (Yedidia et al., 2001; Mohamed & Haggag, 2006).

2. SCOPO DEL LAVORO

L'attività sperimentale condotta al fine di poter realizzare il presente elaborato è stata svolta presso i laboratori di Micologia Fitopatologica del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Agro-ambientali ed il Laboratorio di Analisi Fitopatologiche del CRA-SCS di Battipaglia (CREA). Scopo del lavoro è stato quello di:

- Mettere a punto un sistema di inoculazione artificiale di *F. oxysporum* f. sp. *raphani* (agente causale della tracheofusariosi della rucola) su *Diplotaxis tenuifolia*, in conformità con le normali procedure di allevamento di questa coltura;
- Mettere a punto un sistema di fermentazione su substrato solido di isolati di *Trichoderma* spp., da utilizzare come inoculanti del terreno, e di conservazione della biomassa fungina;
- Individuare uno o più isolati di *Trichoderma* spp. in grado di agire come agenti di lotta biologica nei confronti di *F. oxysporum* f. sp. *raphani*.

Gli isolati potenzialmente benefici sono stati scelti all'interno della collezione fungina del Laboratorio di Patologia vegetale e Micologia del Dipartimento di Scienze Agrarie Alimentari e Agro-ambientali dell'Università di Pisa sulla base di precedenti esperimenti di biocontrollo, mentre gli isolati di *F. oxysporum* spp. saggiati durante la sperimentazione appartengono alla collezione del Laboratorio di Analisi Fitopatologiche del CRA-SCS e sono stati isolati da piante di rucola selvatica e coltivata infette e da seme.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Messa a punto del sistema pianta-patogeno-antagonista

3.1.1. Isolati fungini

Le indagini condotte nell'ambito della presente tesi sono state effettuate utilizzando 10 isolati di *Fusarium oxysporum* (Tabella 3.1) gentilmente forniti dal CRA-SCS sede distaccata di Battipaglia (SA) e 91 isolati di *Trichoderma* (Tabella 3.2) appartenenti alla collezione fungina del Laboratorio di Micologia, Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agroambientali (DISAAA-a) dell'Università di Pisa.

Tutti gli isolati sono mantenuti su Potato Dextrose Agar (PDA) sotto olio alla temperatura di 4°C. Gli isolate di *F. oxysporum* sono stati sottoposti a colture monoconidiali e, insieme con i ceppi massali, depositati nella collezione del Dipartimento.

Tabella 3.1. Isolati di *Trichoderma* provenienti dalla collezione fungina del Laboratorio di Micologia Fitopatologica, DiSAAA-A dell'Università di Pisa.

N. collezione	Genere	Specie	Isolamento	Provenienza	Anno
390	<i>Trichoderma</i>	<i>aureoviride</i>	terreno	S. Rossore, Pisa	1983
456	<i>Trichoderma</i>		terreno	Svizzera	2001
478	<i>Trichoderma</i>	<i>hamatum</i>			1984
673	<i>Trichoderma</i>		terreno	Svizzera	2001
1737	<i>Trichoderma</i>	<i>atroviride</i>		Colignola, Pisa	2003
2046	<i>Trichoderma</i>	<i>koningiopsis</i>			2012
2070	<i>Trichoderma</i>	<i>saturnisporum</i>			1992
2828	<i>Trichoderma</i>		<i>Foeniculum vulgare</i>		2001
2952	<i>Trichoderma</i>			Colignola, Pisa	2003
3117	<i>Trichoderma</i>		Acini d'uva		2009
3142	<i>Trichoderma</i>		Acini d'uva		2009
4207	<i>Trichoderma</i>	<i>asperellum</i>			1997
4602	<i>Trichoderma</i>	<i>asperellum</i>			2003
4603	<i>Trichoderma</i>	<i>asperellum</i>			2003
4839	<i>Trichoderma</i>	<i>minutisporum</i>	Suolo foresta d'Aceri	Quebec, Canada	2003
4841	<i>Trichoderma</i>	<i>stromaticum</i>	pianta morta di <i>Theobroma cacao</i>	Belem, Parà, Brasile	2003
4843	<i>Trichoderma</i>	<i>sinensis</i>	corteccia		2003
4913	<i>Trichoderma</i>	<i>oblongisporum</i>	tronco di <i>Thuja plicata</i>	National Park, Canada	2003

4968	<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>		Sheffield, UK	2003
5182	<i>Trichoderma</i>	<i>effusum</i>		Himalaya, India	2003
5234	<i>Trichoderma</i>	<i>erinaceum</i>	terreno	Coral Island, Thailandia	2003
5626	<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	pianta di <i>Capsicum annuum</i>	Capezzano Pianore, Lucca	1995
5911	<i>Trichoderma</i>	<i>polysporum</i>	sottobosco pineta	Quebec, Canada	2003
5961	<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	terreno	Croazia	2003
6074	<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	terreno	Croazia	2003
6414	<i>Trichoderma</i>	<i>atroviride</i>	terreno	Ucraina	2003
6415	<i>Trichoderma</i>	<i>atroviride</i>	terreno	Ucraina	2003
6424	<i>Trichoderma</i>		pianta di <i>Quercus ilex</i>		2003
6463	<i>Trichoderma</i>		pianta di <i>Gypsophyla spp</i>		2003
6741	<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>		Colignola, Pisa	1998
6755	<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>		Colignola, Pisa	1998
6776	<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>		Colignola, Pisa	1998
6868	<i>Trichoderma</i>		pianta di <i>Eustoma russellianum</i>		1998
6947	<i>Trichoderma</i>		pianta di <i>Carpinus betulus</i>		1998
7630	<i>Trichoderma</i>	<i>viride</i>	torba	Stender, Estonia	2003
7638	<i>Trichoderma</i>		torba	Stender, Estonia	2003
7645	<i>Trichoderma</i>		torba	Stender, Estonia	2003
7651	<i>Trichoderma</i>		torba	Stender, Estonia	2003
7654	<i>Trichoderma</i>		torba	Stender, Estonia	2003
7660	<i>Trichoderma</i>	<i>koningiopsis</i>	torba	Stender, Estonia	2003
7664	<i>Trichoderma</i>	<i>viride</i>	torba	Stender, Estonia	2003
7677	<i>Trichoderma</i>	<i>viride</i>	torba	Stender, Estonia	2003
7680	<i>Trichoderma</i>				2003
7785	<i>Trichoderma</i>	<i>koningiopsis</i>	compost		2004
7804	<i>Trichoderma</i>		compost		2004
7807	<i>Trichoderma</i>		compost		2004
7813	<i>Trichoderma</i>		compost		2004
7835	<i>Trichoderma</i>		compost		2004
7979	<i>Trichoderma</i>		torba	Stender, Estonia	2003
7993	<i>Trichoderma</i>		torba	Stender, Estonia	2003
7995	<i>Trichoderma</i>		torba	Stender, Estonia	2003
8001	<i>Trichoderma</i>		torba	Stender, Estonia	2003
8003	<i>Trichoderma</i>		torba	Stender, Estonia	2003
8005	<i>Trichoderma</i>		torba	Stender, Estonia	2003
8028	<i>Trichoderma</i>		torba	Stender, Estonia	2003
8030	<i>Trichoderma</i>		torba	Stender, Estonia	2003
8119	<i>Trichoderma</i>		torba	Stender, Estonia	2003
8121	<i>Trichoderma</i>		torba	Stender, Estonia	2003
8123	<i>Trichoderma</i>		torba	Stender, Estonia	2003
8144	<i>Trichoderma</i>	<i>viride</i>	torba	Stender, Estonia	2003

8147	<i>Trichoderma</i>		torba	Stender, Estonia	2003
8199	<i>Trichoderma</i>	<i>viride</i>	tronco di <i>Acer spp</i>	Virginia	2004
8200	<i>Trichoderma</i>		pianta di <i>Eucaliptus spp</i>	Australia	2004
8201	<i>Trichoderma</i>	<i>viride</i>	fusto d'albero	Taiwan	2004
8202	<i>Trichoderma</i>	<i>viride</i>	pianta di <i>Pinus spp</i>	Georgia, USA	2004
8203	<i>Trichoderma</i>	<i>viride</i>	acqua stagnante	Danimarca	2004
8204	<i>Trichoderma</i>	<i>viride</i>	cartone	Russia	2004
8207	<i>Trichoderma</i>		fusto d'albero	Nuova Zelanda	2004
8210	<i>Trichoderma</i>	<i>viride</i>	radici infette da <i>Phellinus spp</i>	Oregon, USA	2004
8212	<i>Trichoderma</i>		terreno	Kiev, Ucraina	2004
8213	<i>Trichoderma</i>		terreno	Khmelnitsk, Ucraina	2004
8214	<i>Trichoderma</i>		terreno	Zaporozhye, Ucraina	2004
8216	<i>Trichoderma</i>		compost	Zhytomir, Ucraina	2004
8218	<i>Trichoderma</i>			Kiev, Ucraina	2004
8220	<i>Trichoderma</i>		terreno	Khmelnitsk, Ucraina	2004
8221	<i>Trichoderma</i>			Crimea, Ucraina	2004
8223	<i>Trichoderma</i>			Donotsk, Ucraina	2004
8224	<i>Trichoderma</i>			Kiev, Ucraina	2004
8227	<i>Trichoderma</i>			Kiev, Ucraina	2012
8229	<i>Trichoderma</i>		Terreno	Zaporozhye, Ucraina	2004
8232	<i>Trichoderma</i>			Kiev, Ucraina	2004
8233	<i>Trichoderma</i>	<i>atroviride</i>		Kiev, Ucraina	2010
8234	<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	terreno	Kherson, Ucraina	2012
8241	<i>Trichoderma</i>		terreno	Crimea, Ucraina	2004
8243	<i>Trichoderma</i>			Ternopol, Ucraina	2004
8245	<i>Trichoderma</i>		terreno	Kharkov, Ucraina	2004
8321	<i>Trichoderma</i>	<i>aggressivum</i>	<i>Agaricus bisporus</i>		2004
8342	<i>Trichoderma</i>		<i>Photinia</i>		2004
8486	<i>Trichoderma</i>		terreno argilloso	S.Piero, Pisa	2006
8489	<i>Trichoderma</i>		terreno sabbioso	S.Piero, Pisa	2006
8529	<i>Trichoderma</i>				2006

Tabella 3.2. Isolati di *Fusarium* sp. provenienti dalla collezione fungina del Laboratorio di Analisi Fitopatologiche del CREA SCS - Centro di Sperimentazione e Certificazione delle Sementi di Battipaglia (SA).

Campione n.	Isolato da	Varietà	Provenienza	Anno
08-372 PANT1	Pianta di rucola	Non dichiarata	Campania	2008
10-223 PANT1	Pianta di rucola	Selvatica	Campania	2010
A-548 PANT1	Pianta di rucola	Non dichiarata	Campania	2015
09-413	Pianta di rucola	Selvatica	Campania	2009
08-370 PANT1	Pianta di rucola	Non dichiarata	Campania	2008
10-224 PANT1	Pianta di rucola	Selvatica	Campania	2010
10-005 PANT1	Pianta di rucola	Dorica	Campania	2010
09-407 PAL1	Pianta di rucola	Non dichiarata	Campania	2009
09-488 PANT11	Seme di rucola	Giulia	Campania	2009
07-306 AL1	Pianta di rucola	Non dichiarata	Campania	2007

3.1.2. Scelta del ceppo patogeno: test di patogenicità degli isolati di *F. oxysporum*

Gli isolati monoconidiali di *F. oxysporum* sono stati inviati al CREA SCS di Battipaglia con lo scopo di accertarne la patogenicità e il grado di virulenza.

Il test di patogenicità è stato eseguito secondo il protocollo P15 e P36 CRA SCS (vedi allegati 1 e 2) (Sigillo et al., 2012), impiegato per la determinazione della patogenicità di ceppi fungini attraverso l'inoculo artificiale sull'ospite *Diplotaxis tenuifolia* varietà "Tricia" (Enza Zaden).

Per ogni tesi sono stati seminati 20 semi su vermiculite Ø 2-5 mm in contenitore alveolato a condizioni di crescita controllate di 24°C (12/12h ciclo giorno/notte).

Quando le giovani plantule avevano raggiunto lo stadio di dicotiledoni ben sviluppati è stata procurata una ferita sull'apparato radicale eliminandone la parte terminale con un bisturi sterile.

Le plantule sono state lasciate immerse fino al colletto nella sospensione conidica (10^6 cfu ml⁻¹) di ciascun isolato di *F. oxysporum* per circa 60 secondi.

Il controllo consisteva di 20 piante immerse in acqua sterile deionizzata per 60 secondi.

Le piante inoculate sono state trapiantate in vasi di Ø 8 cm contenenti un substrato composto da sabbia/terriccio 3:1 e poste in camera di crescita a 24°C

(12/12h ciclo giorno/notte).

Durante i venti giorni successivi all'inoculo sono stati effettuati i rilievi dei sintomi utilizzando la seguente scala di valori:

- 0 per le piante sane
- 1 per le piante che manifestavano ingiallimenti
- 2 per le piante avvizzite
- 3 per le piante morte

Per ogni tesi sono stati effettuati 5 isolamenti da piante avvizzite prima della morte per appurare che la malattia fosse causata dal patogeno in esame.

Alla fine del test di patogenicità è stata calcolata l'incidenza della malattia (Disease index "D.I.") utilizzando la seguente formula:

$$D.I. (\%) = \frac{[(n \text{ piante sane} * 0 + n \text{ piante ingiallite} * 1 + n \text{ piante avvizzite} * 2 + n \text{ piante morte} * 3) * 100]}{[(n \text{ piante sane} + n \text{ piante ingiallite} + n \text{ piante avvizzite} + n \text{ piante morte}) * 3]}$$

Il ceppo di *F. oxysporum* che ha causato l'incidenza di malattia più elevata è stato selezionato per le sperimentazioni successive.

3.1.3. Scelta della varietà di *Diplotaxis tenuifolia*

Le varietà di rucola selvatica (*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.) scelte e utilizzate per saggiare il ceppo di *F. oxysporum* (ceppo Fox 10223) precedentemente selezionato sono il risultato di un'indagine conoscitiva dell'areale di produzione (Piana del Sele, Salerno) sulle varietà maggiormente coltivate.

Le sementi delle varietà di rucola selvatica (Tabella 3.3) gentilmente fornite dal CREA SCS sono conservate a 4°C in assenza di umidità in busta sigillata.

Per ogni varietà sono stati seminati 40 semi in vermiculite Ø 2-5 mm e posti a germinare in contenitori alveolati in camera di crescita a 24°C (12/12h ciclo giorno/notte).

Come per il test di patogenicità sopra descritto, le differenti varietà sono state inoculate mediante contatto di una ferita radicale con una sospensione conidica di *F. oxysporum* 10^6 cfu mL⁻¹.

Per ognuna delle due repliche tecniche sono state inoculate 20 piante.

Come controllo, l'apparato radicale di 20 piante per ogni varietà è stato immerso in acqua sterile deionizzata per 60 secondi. Le piante sono state mantenute in camera di crescita a 24°C (12/12h ciclo giorno/notte).

Il rilievo dei sintomi, secondo la scala sintomatologica precedentemente indicata, si è protratto per 20 giorni dalla data di inoculo.

Sulla base del Disease Index è stata selezionata la varietà di rucola selvatica con una suscettibilità medio-alta nei confronti di Fox 10223.

Tabella 3.3. Varietà di Rucola selvatica (*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC) saggiate. Le varietà utilizzate sono state fornite da Ditte Sementiere o da agricoltori della Piana del Sele in busta sigillata, per motivi di privacy non verranno menzionati.

N° collezione	Specie
14-243	<i>Diplotaxis tenuifolia</i>
13-420	
13-466	
13-465	
13-411	
13-389	
13-391	
14-22	
13-398	
13-393	
14-21	
13-395	
13-412	
13-467	
14-244	
13-413	
13-400	
13-408	
13-409	
13-425	
13-496	
13-437	
13-435	
13-433	
14-242	
13-399	
13-186	
13-436	
13-426	
13-422	
13-427	
13-407	
13-410	
13-434	

3.1.4. Test differenziale per la determinazione della *formae speciales* di *F. oxysporum*

L'isolato di Fox 10223 è stato valutato mediante un test differenziale su cavolfiore (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) varietà Palla di neve, ravanello (*Raphanus sativus* L.) varietà Champion e su rucola selvatica (*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.) varietà Tricia in piantine di 2 settimane al fine di identificarne la forma speciale (Toit 2003).

Per ogni combinazione pianta-patogeno, 6 piantine sono state ferite tramite asportazione della parte terminale dell'apparato radicale. Le radici sono state inoculate mediante immersione dell'apparato radicale in una sospensione conidica di Fox 10223 10^6 cfu mL⁻¹

per 60 secondi, trapiantate poi individualmente in un vaso di 10 cm di diametro. Come controllo, 6 piante per ogni specie sono state immerse in acqua sterile deionizzata per 60 secondi. Le piante sono state mantenute in camera di crescita a 24°C (12/12h ciclo giorno/notte). Il rilievo dei sintomi, secondo la scala sintomatologica precedentemente indicata, si è protratto per 22 giorni dalla data di inoculo e sulla base del D.I. è stata valutata la specificità d'ospite dell'isolato e determinata la forma speciale di appartenenza.

Alla fine del test le radici di ravanella sono state pulite con acqua corrente e tagliate longitudinalmente per valutare le alterazioni interne dei tessuti vascolari indotte dal patogeno. Sono stati effettuati reisolamenti su PDA da piante di rucola, cavolfiore e ravanella infette per verificare la presenza del patogeno in presenza di malattia.

3.1.5. Scelta del substrato e concentrazione dell'inoculo patogeno

Dopo aver selezionato il ceppo Fox 10223 e la varietà di rucola selvatica Tricia è stato allestito un test *in vivo* per la determinazione della concentrazione ottimale di inoculo patogeno da impiegare sulla semina. In combinazione con le differenti concentrazioni di inoculo sono stati saggiati differenti substrati di crescita al fine di valutarne l'effetto sull'incidenza della malattia e scegliere il più adatto per le successive prove con gli isolati benefici.

Il patogeno Fox 10223 è stato utilizzato alle concentrazioni di 10^4 , 10^6 e 10^7 cfu mL⁻¹.

Per la preparazione della sospensione conidica sono state seminate piastre Petri (Ø 90 mm) contenenti PDA con il ceppo Fox 10223 e poste in incubatore a 24°C fino al raggiungimento del bordo piastra.

I substrati utilizzati:

- A - Terreno di campo
- B - Terreno di campo sterilizzato
- C - Terriccio (professional typ 6 – cuore verde)

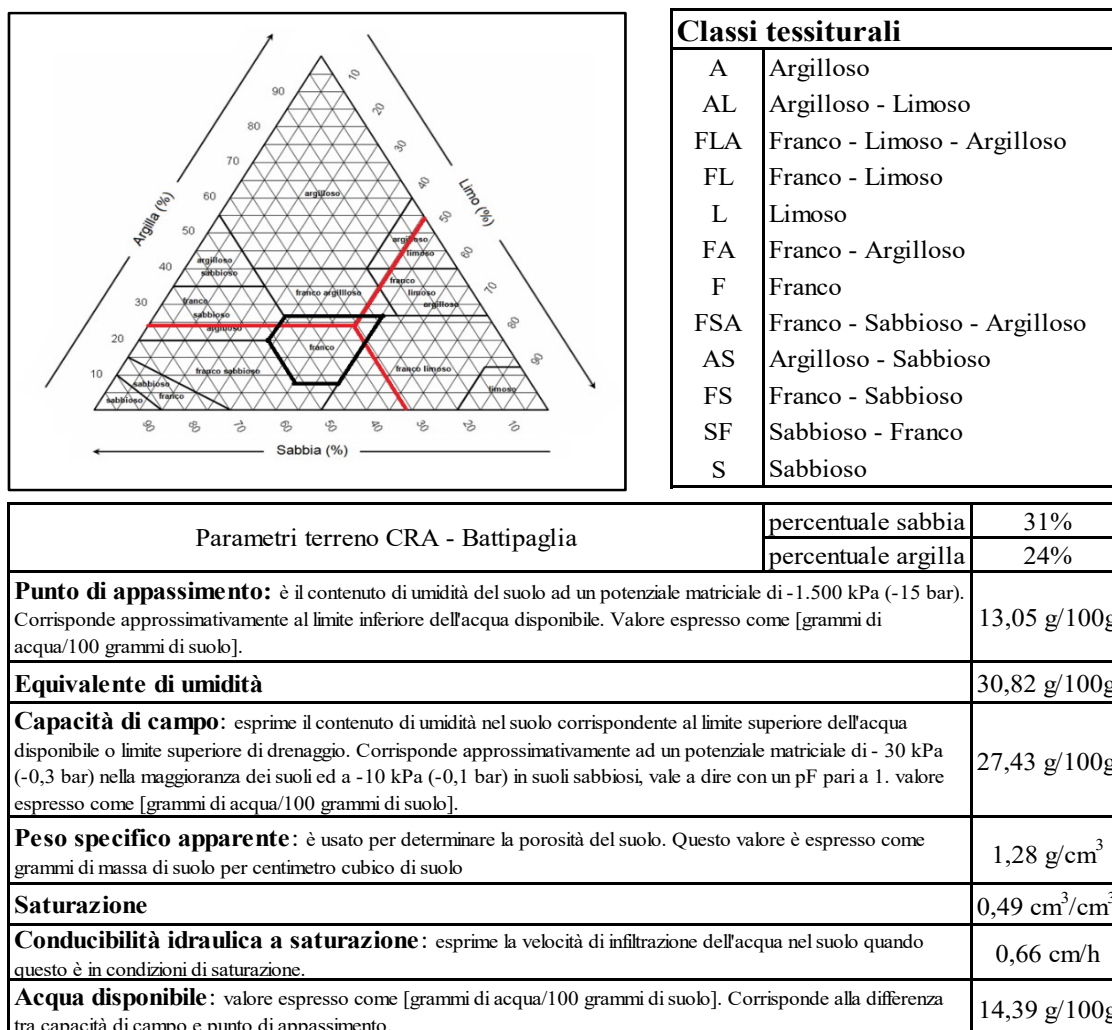
Il substrato A e B utilizzato nell'esperimento proviene dai campi sperimentali dello stesso CREA SCS. Il terreno prelevato è stato essiccato in stufa a 80°C per 48 ore, una parte essiccato e sterilizzato attraverso due cicli a 121°C per 60' a distanza di 24h.

Avvalendosi di analisi chimico-fisiche del terreno di cui disponeva il CREA (Figura 3.1) è stato possibile determinare la tipologia di tessitura del terreno e attraverso il sito dell'ARPA, regione Sardegna <http://www.sar.sardegna.it/servizi/agro/idrosuoli.asp>, è stata individuata la capacità di campo (Figura 3.2) e quindi il volume di sospensione conidica da aggiungere per ottenere una distribuzione omogenea dell'inoculo patogeno. Per quanto riguarda il terriccio, un semplice test sulla massima capacità di imbibizione ci ha consentito di individuare il volume ottimale da somministrare.

Figura 3.1. Analisi chimico-fisiche terreno 2013, CRA SCS – Battipaglia (SA).

ANALISI CHIMICO-FISICHE TERRENO			
Data inizio prove: 25 Gennaio 2013		Data fine prove: 04 Febbraio 2013	
PROVA ANALITICA	VALORE	U.M.	GIUDIZIO
Scheletro	10	g/Kg	SCARSO
Terra fine	990	g/Kg	
Sabbia grossa	177	g/Kg	
Sabbia fine	131	g/Kg	
Limo grosso	19	g/Kg	FRANCO
Limo fine	433	g/Kg	
Argilla	240	g/Kg	
pH (1:2,5)H ₂ O	7,6 A 23°C	Unità di pH	DEBOLMENTE ALCALINO
Calcare totale	<1	g/Kg	POVERO
Calcare attivo	<1	g/Kg CaCO ₂	BASSO
Carbonio organico (metodo Walkey-Black)	10,8	g/Kg	NORMALE
Sostanza organica	18,6	g/Kg	BASSO
Conduttività elettrica (estratto 2:1)	0,11	dS/m a 25°C	
Azoto totale	0,9	g/Kg	BASSO
Fosforo assimilabile	50	mg/Kg P	
Fosforo assimilabile	114	mg/kg P ₂ O ₅	ALTO
Potassio scambiabile	274,3	mg/Kg K	ALTO
Potassio scambiabile	330,6	mg/Kg K ₂ O	MOLTO ELEVATO
Calcio scambiabile	1678,0	mg/Kg Ca	ALTO
Magnesio scambiabile	251,9	mg/Kg Mg	MOLTO ALTO
Sodio scambiabile	20,4	mg/Kg Na	NORMALE
Rapporto C/N	12,6		

Figura 3.2. Tessitura e caratteristiche idrogeologiche del terreno, sito ARPA regione Sardegna. Utilizzando il valore della “Capacità di campo” è stata individuata la quantità massima (in volume) di sospensione conidica da aggiungere al substrato terreno.



La combinazione substrato/sospensione conidica è stata ottenuta versando i due componenti in un sacchetto sterile e miscelando manualmente, per evitare disformità della concentrazione patogena.

Per ogni substrato disposto in vasi di Ø 10cm sono stati aggiunti 36 semi di rucola selvatica varietà Tricia, il tutto è stato allevato in serra vetro con temperatura e umidità monitorate attraverso Datalogger (iLog).

Per ogni tesi sono state allestite 2 repliche.

La valutazione dei sintomi, conclusasi 18 giorni dopo la semina, è stata effettuata mediante la scala sintomatologica precedentemente descritta (vedi paragrafo 3.1.3).

I valori finali di D.I. sono stati impiegati per ottenere curve di crescita della malattia (mediante il software Sigmaplot 11.0) ed sottoposti ad analisi della varianza (mediante il software XLStat 2013) dopo trasformazione angolare.

Figura 3.3.



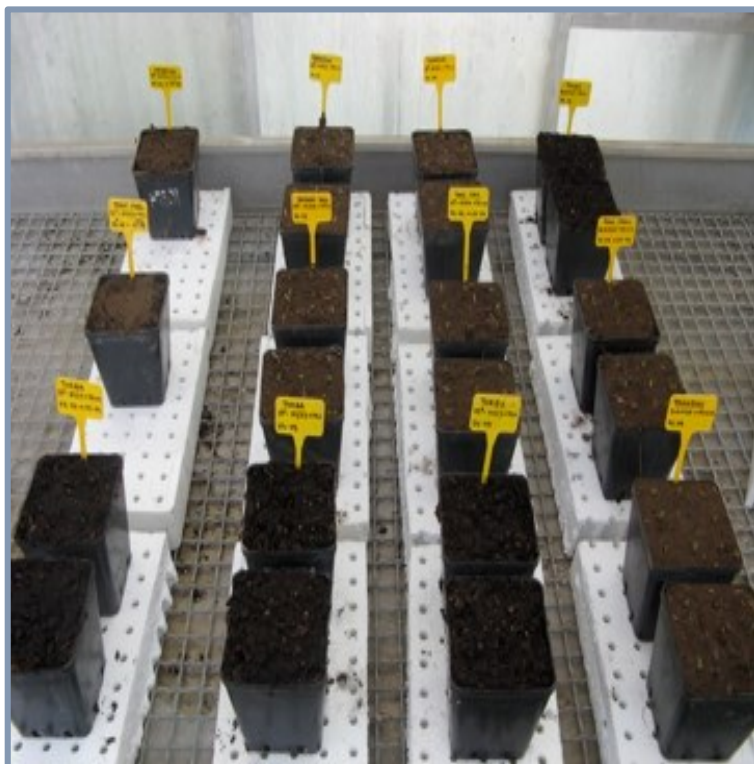
Figura 3.4.



Figura 3.5.



Figura 3.6.



Allestimento del test per la scelta del substrato e della concentrazione dell'inoculo patogeno.

Fig. 3.3. e Fig. 3.4.: aggiunta di H₂O e rimozione delle spore mediante ansa sterile; Fig. 3.5.: semina rucola selvatica in terreno; Fig. 3.6.: test disposto su bancali in serra.

3.2. Selezione degli isolate benefici di *Trichoderma* spp.

Le successive prove hanno previsto l'impiego dei 91 isolati di *Trichoderma* elencati in Tabella 3.1). Per facilitarne l'utilizzo, il trasporto, testare l'attitudine alla manipolazione secondo processi riproducibili su larga scala e la conservazione, gli isolati sono stati allevati su crusca, successivamente essiccati e conservati sottovuoto, secondo il protocollo di seguito descritto.

3.2.1. Preparazione dell'inoculo di *Trichoderma* sp. su crusca

Gli isolati di *Trichoderma* sono stati posti in accrescimento su PDA in piastra Petri da Ø 90 mm e mantenuti in camera di crescita a 24°C (12/12h ciclo giorno/notte). Raggiunta la completa sporulazione, dopo circa 7-10 giorni, è stata preparata una sospensione conidica 10^6 cfu mL⁻¹.

Figura 3.7.



Figura 3.8.



Fig. 3.7: Inoculazione della sospensione conidica di *Trichoderma* su crusca; **Fig. 3.8:** Crusca fermentata (7gg).

Parallelamente all'accrescimento degli isolate su PDA, 182 vasetti “Bormioli” (2x91) da 300 mL contenenti 30g di crusca addizionati di 37,5 mL di acqua deionizzata sono stati sterilizzati a 121°C per 20' per due cicli a distanza di 24h.

Ad ogni vasetto sono stati aggiunti 3,5 mL di ciascuna sospensione conidica (due vasetti per ogni ceppo). I vasetti sono stati agitati per garantire una più uniforme distribuzione dell'inoculo, e sono stati posti in incubatore a 24°C con un turno di illuminazione di 16/8h giorno/notte. Una seconda agitazione manuale è stata effettuata a 24h dall'inoculazione e, quindi, dopo 48h.

Dopo 7 giorni dalla data di inoculazione i vasetti sono stati svuotati e la crusca è stata essiccata in una stufa, a 40°C. Raggiunto il giusto grado di disidratazione (l'agglomerato micelio-crusca si sfaldava con una minima manipolazione) il composto secco pari a circa 20 g/bormioli è stato finemente sminuzzato e disposto in sacchetti sterili sottovuoto.

3.2.2. Selezione dei 91 isolati di *Trichoderma* spp.

La seguente prova è stata effettuata allo scopo di valutare la capacità degli isolati di *Trichoderma* di controllare la malattia causata da Fox su rucola selvatica in condizioni simili alla realtà di serra. La concentrazione 10^4 cfu mL⁻¹ di Fox in combinazione con il terriccio è stata scelta per il saggio degli isolati di *Trichoderma*. Per ottenere l'ingente quantità di inoculo del patogeno (3000 mL), richiesta dall'esperimento, è stato prodotto un terreno di coltura liquido a partire da infuso di patate (200 g L⁻¹ sterilizzato a 121°C per 20', filtrato con carta filtro sterile e addizionato di Destrosio 20 g L⁻¹).

Il brodo di coltura è stato inoculato con un tassello di colonia di Fox, prelevato da PDA, e mantenuto a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ su agitatore orbitale a 80 rpm per 7 giorni.

E' stata effettuata una prima lettura della concentrazione conidica mediante camera di Thoma ed effettuate le dovute correzioni fino al raggiungimento della concentrazione desiderata. Il terriccio, posto in un sacchetto sterile, è stato miscelato con il 5% in peso di crusca fermentata e 150 mL (la metà in volume) di sospensione conidica di Fox 10^4 cfu mL⁻¹ (parametro determinato attraverso test di imbibizione, vedi paragrafo 3.1.6). Il substrato così inoculato è stato suddiviso in 3 vasi di Ø 5 cm e una capienza di 200 mL, 12 semi della varietà Tricia sono stati posti in ogni vaso. Come controllo positivo la rucola è stata seminata in terreno inoculato solo con Fox mentre come controllo negativo per la semina è stato utilizzato terriccio non inoculato. Per ogni tesi sono state allestite 3 repliche. L'esperimento si è svolto dal 10 Novembre al 5 Dicembre 2014 in serra ferro-vetro a temperatura monitorata mediante Datalogger (iLog), irrigazioni e fertirrigazione [2 g·L⁻¹ (Basaplant orange) 14-5-30 sono state gestite attenendosi alle normali esigenze della coltura.

I valori di D.I. finali, ottenuti mediante la formula precedentemente descritta, sono stati sottoposti a trasformazione angolare al fine di eseguire un'analisi della varianza ANOVA (con l'ausilio del software XLStat 2103). I valori del D.I. registrati durante la prova, ogni 3 giorni, sono stati utilizzati per creare una curva di sviluppo della malattia (con l'ausilio del software Sigmaplot 11.0)

3.2.3. Valutazione dell'attività benefica di 26 isolati di *Trichoderma* precedentemente selezionati

Basandosi sui risultati del precedente test sono stati scelti 26 isolati di *Trichoderma* che hanno dato i risultati migliori in termini di controllo della fusariosi per essere utilizzati in una nuova prova al fine di confermare i risultati precedenti e al tempo stesso saggiare gli stessi isolati in condizioni climatiche differenti.

Il substrato è stato inoculato come descritto nel precedente paragrafo. Sono state allestite 9 repliche per tesi in vasi da Ø 5 cm con 12 piante ciascuno per incrementare il pool di dati a disposizione. La semina della rucola è stata effettuata lo stesso giorno, il tutto è stato posto in accrescimento in serra ferro-vetro a temperatura monitorata. L'esperimento si è svolto dal 30 Dicembre 2014 al 26 Gennaio 2015, irrigazioni e fertirrigazione [2 g·L⁻¹ (Basaplant orange) 14-5-30 sono state gestite attenendosi alle normali esigenze della coltura.

I valori di D.I. finali, ottenuti mediante la formula precedentemente descritta, sono stati sottoposti a trasformazione angolare al fine di eseguire un'analisi della varianza ANOVA (con l'ausilio del software XLStat 2103). I valori del D.I. registrati durante la prova, ogni 3 giorni, sono stati utilizzati per creare una curva di sviluppo della malattia (con l'ausilio del software Sigmaplot 11.0)

Tabella 3.4. Elenco dei 26 isolati di *Trichoderma* selezionati e utilizzati nel seguente esperimento.

N. collezione	Genere	Specie	Isolato da	Provenienza	Anno
390	<i>Trichoderma</i>	<i>aureoviride</i>	terreno	S.Rossore, Pisa	1983
456	<i>Trichoderma</i>		terreno	Svizzera	2001
1737	<i>Trichoderma</i>	<i>atroviride</i>		Colignola, Pisa	2003
2828	<i>Trichoderma</i>		<i>Foeniculum vulgare</i>		2001
4968	<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>		Sheffield, UK	2003
5182	<i>Trichoderma</i>	<i>effusum</i>		Himalaya, India	2003
5911	<i>Trichoderma</i>	<i>polysporum</i>	sottobosco pineta	Quebec, Canada	2003
5961	<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	terreno	Croazia	2003
6074	<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	terreno	Croazia	2003
6776	<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>		Colignola, Pisa	1998
7785	<i>Trichoderma</i>	<i>koningiopsis</i>	compost		2004
7835	<i>Trichoderma</i>		compost		2004
7979	<i>Trichoderma</i>		torba	Stender, Estonia	2003
8001	<i>Trichoderma</i>		torba	Stender, Estonia	2003
8203	<i>Trichoderma</i>	<i>viride</i>	acqua stagnante	Danimarca	2004
8207	<i>Trichoderma</i>		fusto d'albero	Nuova Zelanda	2004
8212	<i>Trichoderma</i>		terreno	Kiev, Ucraina	2004
8214	<i>Trichoderma</i>		terreno	Zaporozhye, Ucraina	2004
8223	<i>Trichoderma</i>			Donotsk, Ucraina	2004
8227	<i>Trichoderma</i>			Kiev, Ucraina	2012
8232	<i>Trichoderma</i>			Kiev, Ucraina	2004
8233	<i>Trichoderma</i>	<i>atroviride</i>		Kiev, Ucraina	2010
8234	<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	terreno	Kherson, Ucraina	2012
8243	<i>Trichoderma</i>			Ternopol, Ucraina	2004
8486	<i>Trichoderma</i>		terreno argilloso	S.Piero, Pisa	2006
8489	<i>Trichoderma</i>		terreno sabbioso	S.Piero, Pisa	2006

3.2.4. Prova di antagonismo *in vitro*

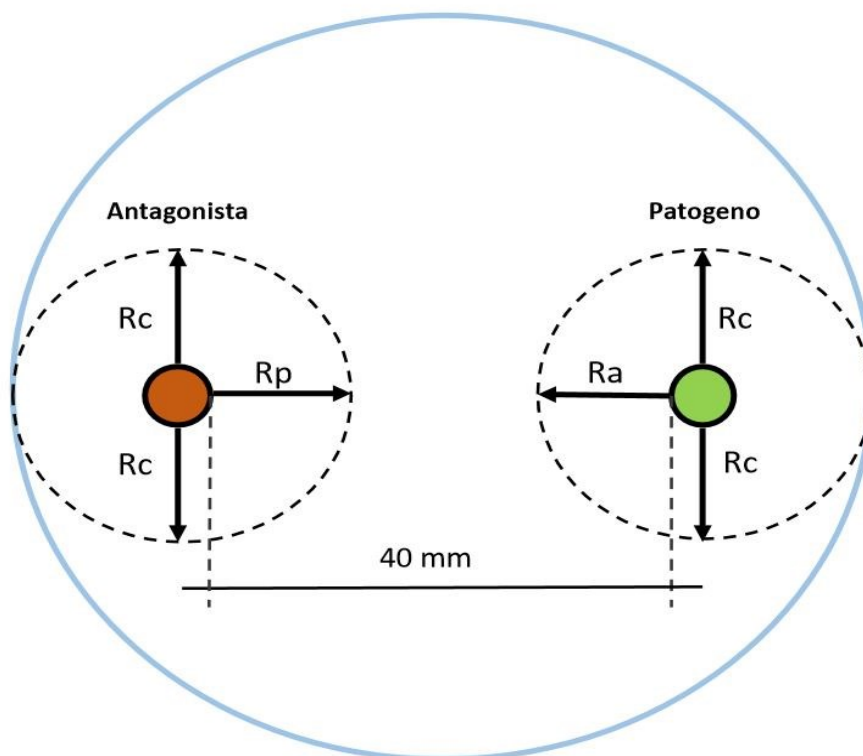
I 26 ceppi di *Trichoderma* sono stati testati *in vitro* al fine di valutare la loro capacità antagonista nei confronti di *F. oxysporum* 10223, in vista di un possibile impiego nella lotta biologica a questo patogeno. Per la prova d'inibizione è stato utilizzato come substrato di crescita Potato Dextrose Agar (PDA). Dischetti di micelio del diametro di 6 mm, praticati da piastre di PDA contenenti Fox 10223 e i 26 isolati di *Trichoderma* in attivo accrescimento, sono stati prelevati ed utilizzati per inoculare le piastre delle colture duali. In particolare i suddetti dischetti sono stati posti su piastre da 90 mm di diametro ad una distanza reciproca di 40 mm. Per ogni combinazione Fox/*Trichoderma* sono state allestite tre repliche. Le piastre sono state incubate a 24 °C con alternanza luce/buio di 12h fino al momento in cui i funghi raggiungevano il bordo della piastra o i miceli venivano a contatto.

Sono stati misurati il raggio controllo e il raggio verso l'antagonista per entrambi gli isolati presenti su piastra (Figura 3.1), prendendo tre misure al giorno.

I valori ottenuti sono stati utilizzati per creare le curve di crescita (con l'ausilio del software Sigmaplot 11.0). Le curve (controllo e verso l'antagonista) ottenute sono state confrontate mediante analisi della varianza della regressione al fine di confrontare le pendenze delle curve (velocità di crescita) assumendo $P \leq 0.05$ come valore significativo (utilizzando il software GraphPad Prism 5).

Al fine di verificarne la capacità micoparassitaria, i 26 isolati di *Trichoderma* sono stati testati contro il patogeno ponendo i dischetti di micelio di 6 mm di diametro su cellophane sterile posto su WA (Water Agar, agar $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), incubando le piastre a 24°C con alternanza luce/buio di 12h, al fine di verificare, con l'utilizzo del microscopio ottico, al momento del contatto tra le due colonie la presenza di coilings. Anche per questa prova sono state allestite tre repliche.

Figura 3.1. Schema di inoculo e misurazione per la prova di inibizione *in vitro*.



Antagonista: isolati *Trichoderma*, Patogeno: *F. oxysporum* 10223; Rc: Raggio controllo; Rp: Raggio verso la colonia del patogeno; Ra: raggio verso la colonia dell'antagonista.

4. RISULTATI

4.1. Messa a punto del sistema pianta-patogeno-antagonista

4.1.1. Scelta del ceppo patogeno: test di patogenicità di isolati *Fusarium oxysporum*

Il test di patogenicità degli isolati di *Fusarium oxysporum* è stato eseguito presso il CREA SCS di Battipaglia (SA) attenendosi ai protocolli interni P15 (preparazione di una sospensione conidica rev. 2) e P39 (resistenza alla tracheofusariosi della rucola rev. 2). I risultati ottenuti, espressi come Disease Index (D.I.) sono di seguito riportati (tabella 4.1.).

Tabella 4.1. Disease index (%) relativa ai diversi isolati di *Fusarium oxysporum*.

Isolato di Fox	Varietà rucola	Data semina	Data inoculo	Data fine prova	Disease Index (%)
07-306	Tricia (Enza Zaden) 13-386	03 Aprile 2014	23 Aprile 2014	16 Maggio 2014	16,7
08-370					50,0
08-372					39,6
09-407					18,8
09-413					29,6
09-488					0,0
10-005					12,5
10-223					74,5
10-224					13,7
A-548					8,3

I valori riferiti al D.I. sono stati calcolati utilizzando la formula riportata nel paragrafo 3.1.3.

Sulla base dell'elevata patogenicità – espressa come D.I. = 74,5% – è stato scelto l'isolato Fox 10-223 per le successive prove.

4.1.2. Scelta della varietà di *Diplotaxis tenuifolia*

Le varietà di rucola utilizzate, rappresentative dello scenario varietale della Piana del Sele (SA), sono state selezionate all'interno della collezione del CREA SCS di Battipaglia. I risultati del test di resistenza alla tracheofusariosi della rucola, condotto secondo protocollo P36 (CREA-SCS) evidenzia come ci sia una differente suscettibilità al patogeno nelle differenti varietà di rucola.

La varietà Tricia – Enza Zaden, che ha mostrato il 66,5% di suscettibilità alla malattia è stata scelta per il proseguo di questo lavoro. Il nostro obiettivo era quello di utilizzare una varietà che avesse una suscettibilità medio alta alla malattia per evidenziare e quantificare, in caso di esito positivo, gli effetti antagonisti del/i ceppo/i di *Trichoderma* nei confronti di *Fusarium oxysporum*.

Tabella 4.2. Valori di Disease Index su differenti varietà di rucola selvatica utilizzate nell'areale di produzione della Piana del Sele (SA). In tabella sono riportati i valori medi ottenuti da 2 repliche. La varietà Tricia 13-186 della ditta Enza Zaden è stata selezionata.

N. collezione	Disease index
14-243	11,4
13-420	20,0
13-466	23,9
13-465	26,8
13-411	30,0
13-389	30,6
13-391	30,6
14-22	34,3
13-398	35,9
13-393	37,9
14-21	38,3
13-395	38,4
13-412	39,6
13-467	42,0
14-244	42,3
13-413	42,4
13-400	43,2
13-408	44,2
13-409	44,2
13-425	44,2
13-496	47,5
13-437	49,2
13-435	49,6
13-433	52,9
14-242	54,5
13-399	56,0
13-436	61,4
13-426	61,4
13-422	62,0
13-427	65,9
13-186	66,5
13-407	67,5
13-410	73,4
13-434	75,8

4.1.3. Test differenziale

Il ceppo patogeno Fox 10223 è stato inoculato artificialmente su tre differenti ospiti (cavolfiore, ravanello e violaccioca) al fine di identificare la sua *forma specialis*. Il range di ospiti di *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* è limitato al ravanello e alla rucola, la f. sp. *matthioli* alla violaccioca e la f. sp. *conglutinans* è patogena per molte brassicaceae, incluso cavolfiore (L. J. du Toit and G. Q. Pelter, 2003). In tutte le piante di ravanello inoculate sono stati osservati i sintomi della malattia, ma non su cavolfiore e violaccioca. La sintomatologia variava dall'ingiallimento di una singola foglia all'appassimento dell'intera pianta fino alla morte in tre settimane dalla data di inoculo. Le piante di ravanello infette presentavano un imbrunimento dei vasi conduttori che variava dal 30 al 100% delle piante, sintomo assente su le altre specie.

I risultati del test di patogenicità sono riportati in tabella 4.3. Su questa base il nostro isolato è assegnato a *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani*.

Tabella 4.3. Determinazione della forma speciale di Fox 10223 attraverso test differenziale su ospiti specifici.

Specie	Varietà	Data semina	Data inoculo	Data rilievo	Mortalità (%)
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Palla di neve	26-08-2014 (t 0)	05-09-2014 (+10 gg)	15-09-2014 (+ 20 gg)	0/20 (0%)
<i>Raphanus sativus</i>	Champion				16/20 (80%)
<i>Matthiola incana</i>	Regal with				0/20 (0%)

4.1.4. Scelta del substrato e della concentrazione dell'inoculo patogeno

L'esperimento ha previsto l'impiego della varietà di rucola Tricia e il ceppo patogeno Fox 10223 a tre concentrazioni d'inoculo differenti su tre differenti substrati precedentemente elencati nel paragrafo 3.1.5.

Per ogni tesi, durante tutto l'esperimento, sono stati registrati i valori di D.I. I grafici di seguito riportati mostrano la curva di sviluppo della malattia nel tempo a differenti concentrazioni del patogeno e sui differenti substrati.

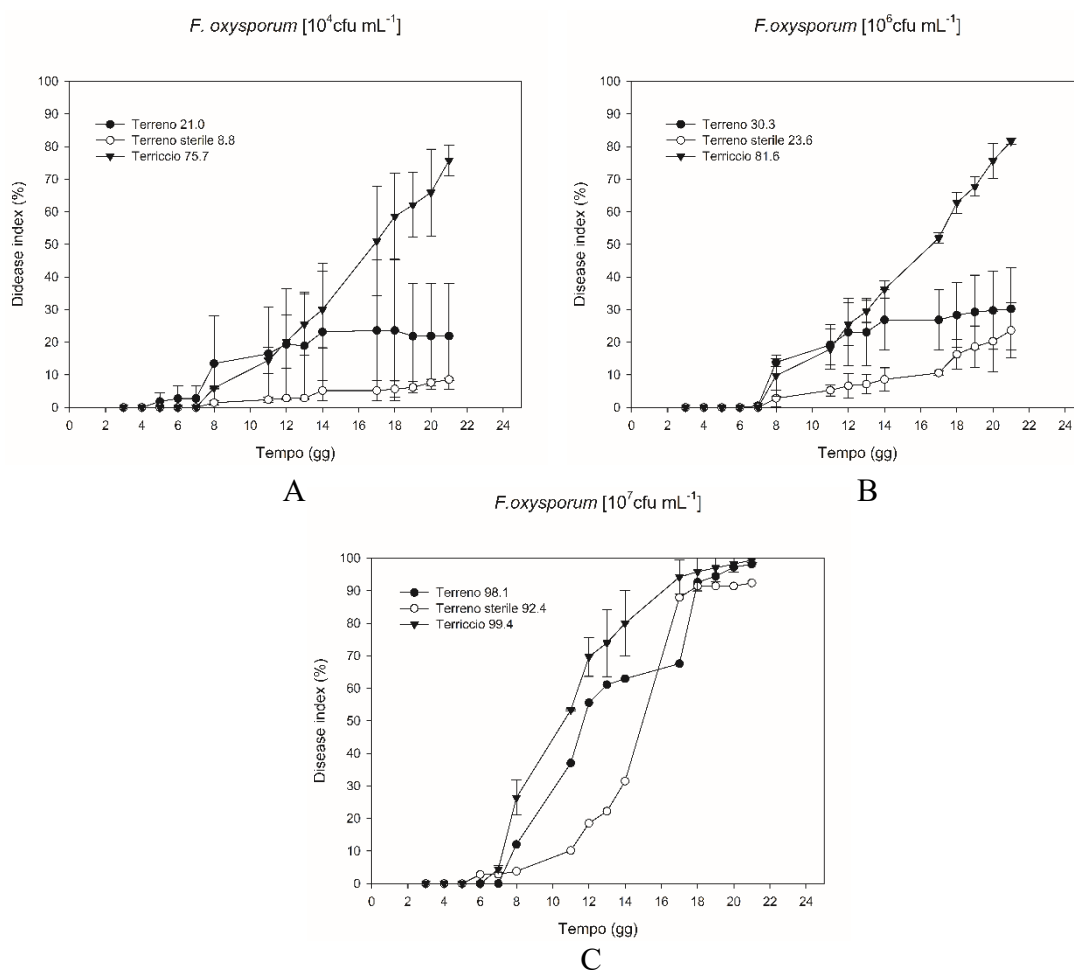


Figura 4.1. Andamento della malattia nel tempo su rucola, sui differenti substrati. A: Fox 10⁴ cfu mL⁻¹; B: Fox 10⁶ cfu mL⁻¹; C: Fox 10⁷ cfu mL⁻¹ (software Sigmaplot 11.0).

In tutte le prove, indipendentemente dalla concentrazione del patogeno, lo sviluppo della malattia su rucola è maggiore su terriccio con incidenze finali che vanno dal 75,7% in presenza di un inoculo del patogeno pari a 10⁴ cfu mL⁻¹, fino al 99,4% con un inoculo del patogeno pari a 10⁷ cfu mL⁻¹. Su terreno e terreno sterile i valori di D.I. sono pressoché simili ma inferiori al terriccio tranne nel grafico C (*F. oxysporum* 10⁷ cfu mL⁻¹) dove la malattia si è attestata con valori superiori al 90% indipendentemente dal substrato utilizzato.

I risultati dell'analisi della varianza condotta sui valori di D.I. (previa trasformazione angolare) sono di seguito riportati.

Tabella 4.4. Analisi della varianza (ANOVA) relativa al D.I., condotta utilizzando la concentrazione del patogeno, il tipo di substrato e la loro interazione come fonti di variabilità.

Analisi della varianza	
Fonte di variabilità	P value
Concentrazione patogeno	0.000
Substrato	0.000
Concentrazione * Substrato	0.001

Poiché dall'analisi generale l'interazione concentrazione*substrato è risultata significativa, su questa è stata condotta la successiva analisi mediante Tukey test.

Tabella 4.5. Parwise comparison (Tukey test) relativa ai valori di D.I. A lettere differenti corrispondono valori significativamente differenti ($P \leq 0.05$).

Tesi	D.I. (%)	
10^7 cfu mL ⁻¹ - terriccio	99.4	a
10^7 cfu mL ⁻¹ - terreno	98.1	a b
10^7 cfu mL ⁻¹ - terreno sterile	92.4	a b
10^6 cfu mL ⁻¹ - terriccio	81.6	b
10^4 cfu mL ⁻¹ - terriccio	75.7	b
10^6 cfu mL ⁻¹ - terreno	30.3	c
10^6 cfu mL ⁻¹ - terreno sterile	23.6	c
10^4 cfu mL ⁻¹ - terreno	21.9	c
10^4 cfu mL ⁻¹ - terreno sterile	8.6	c d
Ctrl - terreno	0	d
Ctrl - terreno sterile	0	d
Ctrl - terriccio	0	d

Sulla base dei risultati ottenuti dell'analisi della varianza, le prime cinque combinazioni concentrazione patogeno/substrato appaiono essere le più interessanti, con la tesi che prevede la massima concentrazione del patogeno (10^7 cfu mL⁻¹) in terriccio in cui si è registrato un livello di malattia pari al 99.4%.

All'interno di questo gruppo si è deciso di utilizzare una concentrazione di patogeno pari a 10^4 cfu mL⁻¹ in terriccio (vedi grafico 4.1.A) - D.I. 75,7% - per il prosieguo del lavoro.

4.2. Selezione degli isolati benefici di *Trichoderma* spp.

4.2.1. Valutazione dell'effetto benefico di 91 isolati di *Trichoderma* spp.

L'analisi della varianza, effettuata con un intervallo di confidenza del 95%, ha permesso di individuare quali isolati di *Trichoderma* potessero essere potenzialmente in grado, in presenza di una concentrazione nota di *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* e in determinate condizioni ambientali, di limitare in modo significativo lo sviluppo della malattia. In tabella 4.6 è riportato quanto ottenuto dall'analisi della varianza (ANOVA) e dal confronto multiplo mediante Tukey test dei dati relativi ai D.I. registrati in questo esperimento.

A causa dell'elevata variabilità registrata, per 89 dei 91 isolati di *Trichoderma* testati, non è stato registrato un indice di malattia significativamente differente rispetto al controllo inoculato con il solo patogeno ($Fox\ 10^4\ cfu\ mL^{-1}$). Infatti solo gli isolati T6074 e T8203 sono risultati statisticamente differenti dal controllo infetto – con una significatività, rispettivamente, di $P=0.029$ e $P=0.002$ - e uguali al controllo sano.

Nella prova *in vivo*, alla fine della sperimentazione, le piante di rucola del controllo non inoculato con *Trichoderma* e *F. oxysporum* f. sp. *raphani*, manifestavano una colorazione bruna/rossastra delle foglie, probabilmente legata alla sintesi e all'accumulo di antocianine all'interno della lamina fogliare in seguito a stress abiotici. Alcune tesi trattate con *Trichoderma* non solo non hanno manifestato tali sintomi ma è stata osservata un'azione di stimolo sulla vigoria della pianta (vedi foto in alto); per questo motivo sono stati selezionati nella seconda prova di seguito descritta. Altra osservazione degna di nota è l'effetto brachizzante che il ceppo T 6074 ha indotto sulla rucola (vedi foto in basso).



T 6074

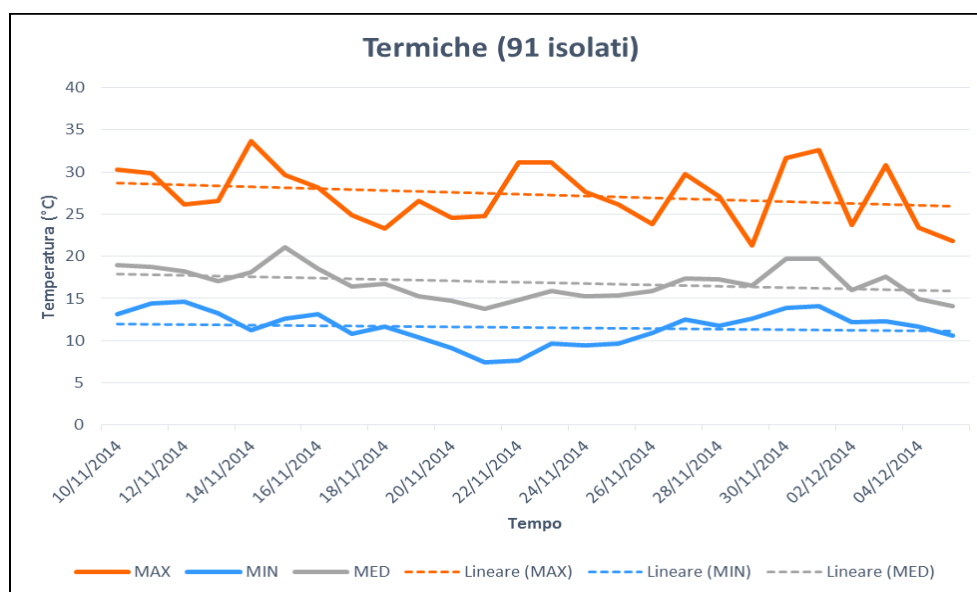
T 8203

Tabella 4.6. Effetto dell'applicazione al terreno di 91 isolati di *Trichoderma* sullo sviluppo della tracheofusariosi della rucola (espressa come D.I.) causata da *F. oxysporum* f. sp. *raphani*. A lettera uguale corrispondono valori uguali (ANOVA, Tukey test) per $P < 0.05$. Gli isolati selezionati per la prova successiva sono evidenziati con un asterisco “*”.

Isolati	D.I. (%)				
<i>T</i> 8030	75.1	a	<i>T</i> 4913	32.4	a b c d e f
<i>T</i> 4839	67.9	a b	<i>T</i> 7813	31.7	a b c d e f
<i>T</i> 8529	65.8	a b	<i>T</i> 2952	31.5	a b c d e f
<i>T</i> 8213	65.8	a b	<i>T</i> 7807	31.1	a b c d e f
<i>Fox</i> 10⁴	65.3	a b c	<i>T</i> 6947	31.0	a b c d e f
<i>T</i> 7680	64.2	a b c	<i>T</i> 7995	30.7	a b c d e f
<i>T</i> 6415	61.4	a b c	<i>T</i> 7638	29.8	a b c d e f
<i>T</i> 7664	61.0	a b c	<i>T</i> 6463	29.6	a b c d e f
<i>T</i> 4602	59.1	a b c d	<i>T</i> 7993	29.2	a b c d e f
<i>T</i> 645	58.5	a b c d	<i>T</i> 478	29.1	a b c d e f
<i>T</i> 8144	55.6	a b c d	<i>T</i> 390*	28.6	a b c d e f
<i>T</i> 8199	54.7	a b c d	<i>T</i> 6868	28.5	a b c d e f
<i>T</i> 5626	52.4	a b c d	<i>T</i> 456*	28.3	a b c d e f
<i>T</i> 7804	52.4	a b c d	<i>T</i> 6741	28.0	a b c d e f
<i>T</i> 4207	50.8	a b c d e	<i>T</i> 8204	27.9	a b c d e f
<i>T</i> 7677	50.6	a b c d e	<i>T</i> 2046	27.9	a b c d e f
<i>T</i> 673	48.9	a b c d e	<i>T</i> 8119	27.8	a b c d e f
<i>T</i> 8216	48.1	a b c d e	<i>T</i> 8220	26.9	a b c d e f
<i>T</i> 4843	48.1	a b c d e	<i>T</i> 7660	25.4	a b c d e f
<i>T</i> 8121	47.7	a b c d e	<i>T</i> 8003	25.1	a b c d e f
<i>T</i> 8202	47.0	a b c d e	<i>T</i> 8342	24.7	a b c d e f
<i>T</i> 8005	45.8	a b c d e	<i>T</i> 8489*	24.0	a b c d e f
<i>T</i> 6414	45.8	a b c d e	<i>T</i> 8234*	23.9	a b c d e f
<i>T</i> 8123	45.4	a b c d e	<i>T</i> 4968*	23.9	a b c d e f
<i>T</i> 5234	45.2	a b c d e	<i>T</i> 7835*	23.5	a b c d e f
<i>T</i> 6424	44.4	a b c d e	<i>T</i> 8212*	23.3	a b c d e f
<i>T</i> 7630	43.2	a b c d e f	<i>T</i> 7654	22.6	a b c d e f
<i>T</i> 8201	42.9	a b c d e f	<i>T</i> 8214*	21.4	a b c d e f
<i>T</i> 4603	42.2	a b c d e f	<i>T</i> 4841	20.9	a b c d e f
<i>T</i> 8245	41.4	a b c d e f	<i>T</i> 8233*	20.0	a b c d e f
<i>T</i> 8200	41.1	a b c d e f	<i>T</i> 8207*	19.8	a b c d e f
<i>T</i> 8221	40.1	a b c d e f	<i>T</i> 8232*	18.5	a b c d e f
<i>T</i> 8028	40.0	a b c d e f	<i>T</i> 3117	17.6	a b c d e f
<i>T</i> 8241	38.8	a b c d e f	<i>T</i> 5961*	17.3	a b c d e f
<i>T</i> 8218	37.9	a b c d e f	<i>T</i> 8227*	17.3	a b c d e f
<i>T</i> 2070	37.7	a b c d e f	<i>T</i> 8001*	17.0	a b c d e f
<i>T</i> 7979*	37.3	a b c d e f	<i>T</i> 5182*	16.7	a b c d e f
<i>T</i> 3142	36.9	a b c d e f	<i>T</i> 6776*	16.7	a b c d e f
<i>T</i> 8229	35.7	a b c d e f	<i>T</i> 8224	16.1	a b c d e f
<i>T</i> 8321	35.4	a b c d e f	<i>T</i> 7785*	15.9	b c d e f
<i>T</i> 5911*	34.6	a b c d e f	<i>T</i> 8243*	15.9	b c d e f
<i>T</i> 7651	34.3	a b c d e f	<i>T</i> 8147	15.3	b c d e f
<i>T</i> 6755	33.3	a b c d e f	<i>T</i> 2828*	14.1	b c d e f
<i>T</i> 8210	33.0	a b c d e f	<i>T</i> 8486*	12.8	b c d e f
			<i>T</i> 8223*	11.9	b c d e f
			<i>T</i> 1737*	6.6	c d e f
			<i>T</i> 8203	5.1	d e f
			<i>T</i> 6074	1.9	e f
			Ctrl	0	f

Per completezza di informazione, di seguito viene riportato l'andamento termico durante la sperimentazione. La temperatura massima giornaliera registrata nel periodo ha un andamento lineare che va dai 28 ai 26°C mentre la minima si aggira poco sopra i 10°C, ottenendo delle temperature medie giornaliere comprese tra i 18 e i 16°C (vedi Figura 4.2).

Figura 4.2. Andamento delle temperature durante il saggio dei 91 isolati di *Trichoderma*.



I grafici nella figura 4.3 mostrano l'andamento della malattia in presenza dei due isolati di *Trichoderma* T6074 (4.3A) e T8203 (4.3B) che hanno dato risultati statisticamente differenti dal controllo Fox 10^4 cfu mL⁻¹. Come possiamo notare (vedi grafico 4.3) l'incidenza della malattia in presenza dei due ceppi va dal 1,85% in presenza di T6074 a 6,57% in presenza di T8203, ben al di sotto di quanto registrato nel controllo inoculato dove si raggiunge un indice del 65,3%.

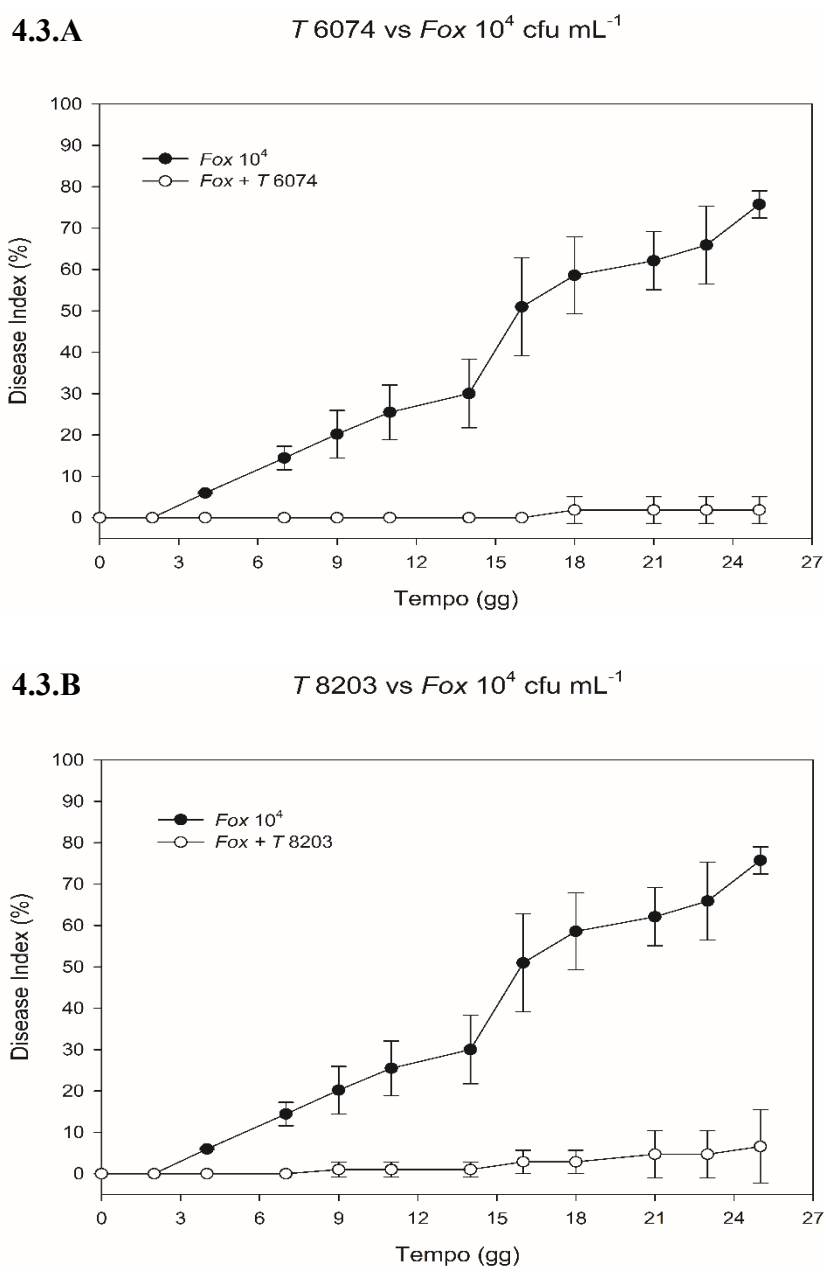


Figura 4.3. Confronto dell'andamento della malattia tra il controllo positivo “●” inoculato con Fox 10^4 e i due isolati di *Trichoderma* “○”.

4.2.2. Saggio di 26 isolati di *Trichoderma*

I 26 isolati di *Trichoderma* impiegati in questo saggio (vedi tabella 3.4) comprendono i due isolati risultati statisticamente significativi T 6074 e T 8203 a cui ne sono stati aggiunti altri 24 che comprendono gli isolati che hanno dato basse % di D.I. in termini di valore assoluto e alcuni isolati che pur non controllando la malattia hanno manifestato un effetto positivo sulla vigoria della pianta. I ceppi selezionati sono riportati in tabella 4.6 con un asterisco.

In questa prova gli isolati T8203 ($P=0.045$) e T7835 ($P=0.001$) sono risultati statisticamente differenti dal controllo inoculato. Sebbene mostranti valori di D.I. non molto superiori rispetto al controllo negativo, i risultati appaiono statisticamente differenti.

I dati ottenuti dall'attuale sperimentazione ci consentono di confermare l'azione di biocontrollo dell'isolato di *Trichoderma* T8203, anche in queste condizioni termiche - differenti rispetto al precedente esperimento - che si scostano dall'optimum di accrescimento fungino.

Tabella 4.7. Effetto di 26 isolati di *Trichoderma* sull'insorgenza della tracheofusariosi della rucola dovuta a *F. oxysporum* f. sp. *raphani*. A lettere differenti corrispondono valori di D.I. significativamente differenti (Analisi della varianza e Tukey test) per $P < 0.5$ **Ctrl**: terreno non inoculato; **Fox 10⁴**: terreno inoculato con il patogeno.

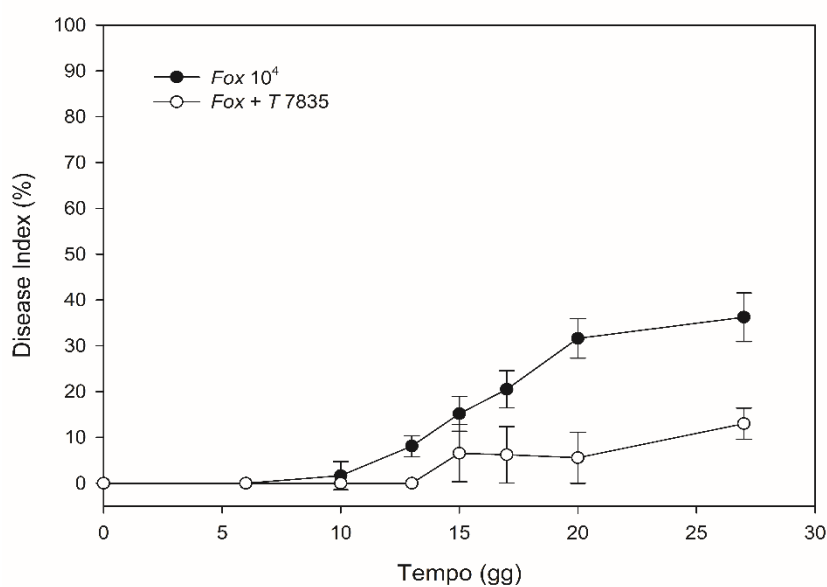
Isolati	D.I. (%)	
<i>T</i> 8486	66.2	a
<i>T</i> 8214	57.5	a b
<i>T</i> 8489	55.6	a b
<i>T</i> 390	50.7	a b c
<i>T</i> 8243	50.4	a b c
<i>T</i> 5911	49.2	a b c
<i>T</i> 456	48.6	a b c
<i>T</i> 6074	48.3	a b c
<i>T</i> 5961	47.7	a b c
<i>T</i> 8227	46.9	a b c
<i>T</i> 5182	44.9	a b c d
<i>T</i> 8223	43.1	a b c d
<i>T</i> 8234	39.7	b c d
<i>T</i> 8233	38.2	b c d
<i>T</i> 7785	36.8	b c d
Fox 10⁴	36.5	b c d
<i>T</i> 1737	35.8	b c d e
<i>T</i> 8232	35.7	b c d e
<i>T</i> 8212	33.9	b c d e
<i>T</i> 7979	33.2	b c d e f
<i>T</i> 8207	31.3	c d e f
<i>T</i> 4968	30.7	c d e f
<i>T</i> 6776	30.6	c d e f
<i>T</i> 2828	30.1	c d e f
<i>T</i> 8001	23.4	d e f
<i>T</i> 8203	16.9	e f
<i>T</i> 7835	12.9	f
Ctrl	0.0	g

La figura 4.4 mostra l'andamento della malattia in presenza dei due isolati di *Trichoderma* T7835 (A) e T8203 (B). L'incidenza della malattia in presenza dei due ceppi arriva ad un massimo di 13.2% per T7835) e al 17.03% per T8203, rispetto al controllo inoculato (36.23%).

Figura 4.4. Andamento della malattia in presenza del patogeno e dell'isolato T7835 (A) e T8203 (B).

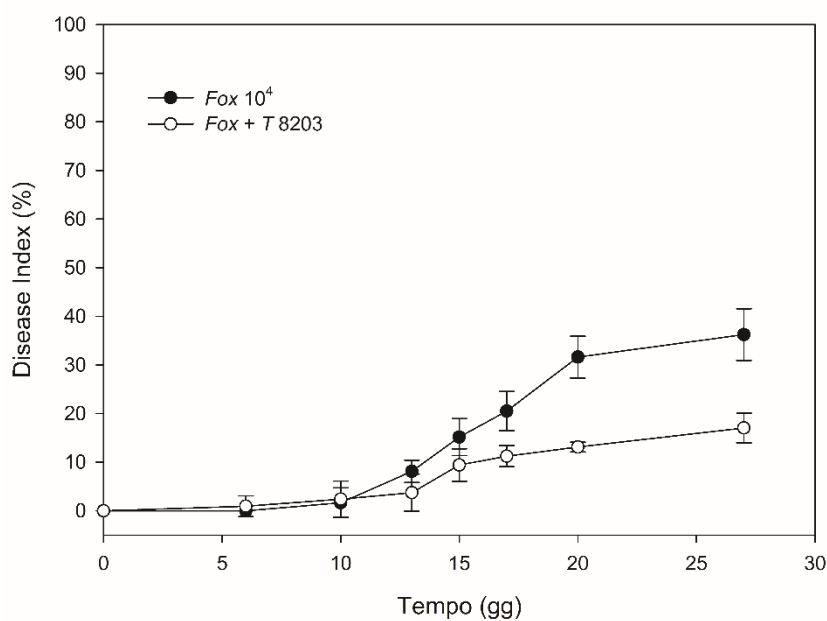
4.4.A

T 7835 vs *Fox* 10⁴ cfu mL⁻¹



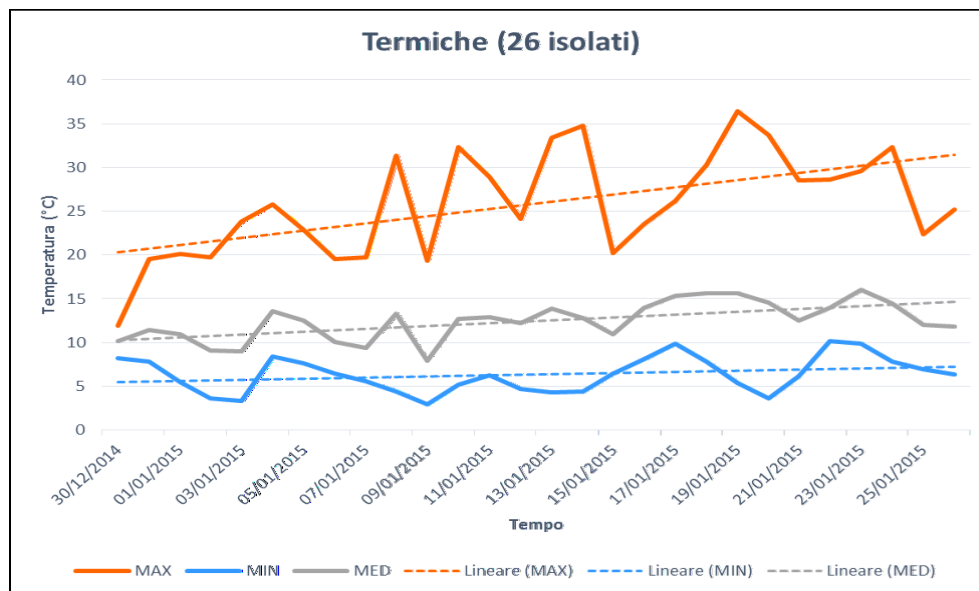
4.4.B

T 8203 vs *Fox* 10⁴ cfu mL⁻¹



Le temperature registrate nel periodo di sperimentazione sono state nettamente più basse rispetto al precedente esperimento, come mostrato nella figura 4.5.

Figura 4.5. Andamento delle temperature durante l'esperimento condotto con i 26 isolati di *Trichoderma*.



4.2.3. Prova di inibizione *in vitro*

La prova di inibizione *in vitro* ha permesso di valutare la crescita miceliare del patogeno *F. oxysporum* f. sp. *raphani* (10223) in presenza dei 26 isolati benefici di *Trichoderma* spp. Quando i dati della crescita (raggio verso l'antagonista/patogeno e raggio controllo) sono stati utilizzati per l'analisi della regressione, i 26 isolati hanno mostrato curve di crescita altamente significative ($R^2 \geq 0.892$ e $P < 0.0001$).

L'analisi della varianza della regressione ha permesso, attraverso il confronto delle pendenze delle curve (velocità di crescita), di verificare eventuali effetti di inibizione della crescita dei funghi quando allevati in colture duali. In particolare, quando *F. oxysporum* è stato fatto crescere in presenza di 13 isolati di *Trichoderma* (Tabella 4.8), sono stati osservati valori statisticamente significativi nella P slope ($P \leq 0.05$) mentre per gli isolati T5961 e T8212 una differenza statisticamente significativa nella P elevation ($P \leq 0.05$).

Tabella 4.8. Analisi della varianza della regressione delle curve di crescita di *F. oxysporum* f. sp. *raphani* in presenza e in assenza (raggio controllo) dei 26 isolati di *Trichoderma* spp. in colture duali su PDA. Fox ctrl: crescita di *F. oxysporum* f. sp. *raphani* nella direzione di controllo; Fox a: crescita di *F. oxysporum* f. sp. *raphani* nella direzione dell'antagonista; P: significatività della retta di regressione; P slope: significatività della differenza tra le slope delle rette nella direzione dell'antagonista e il controllo; P elevation: significatività della differenza delle elevations tra le rette nella direzione dell'antagonista e il controllo.

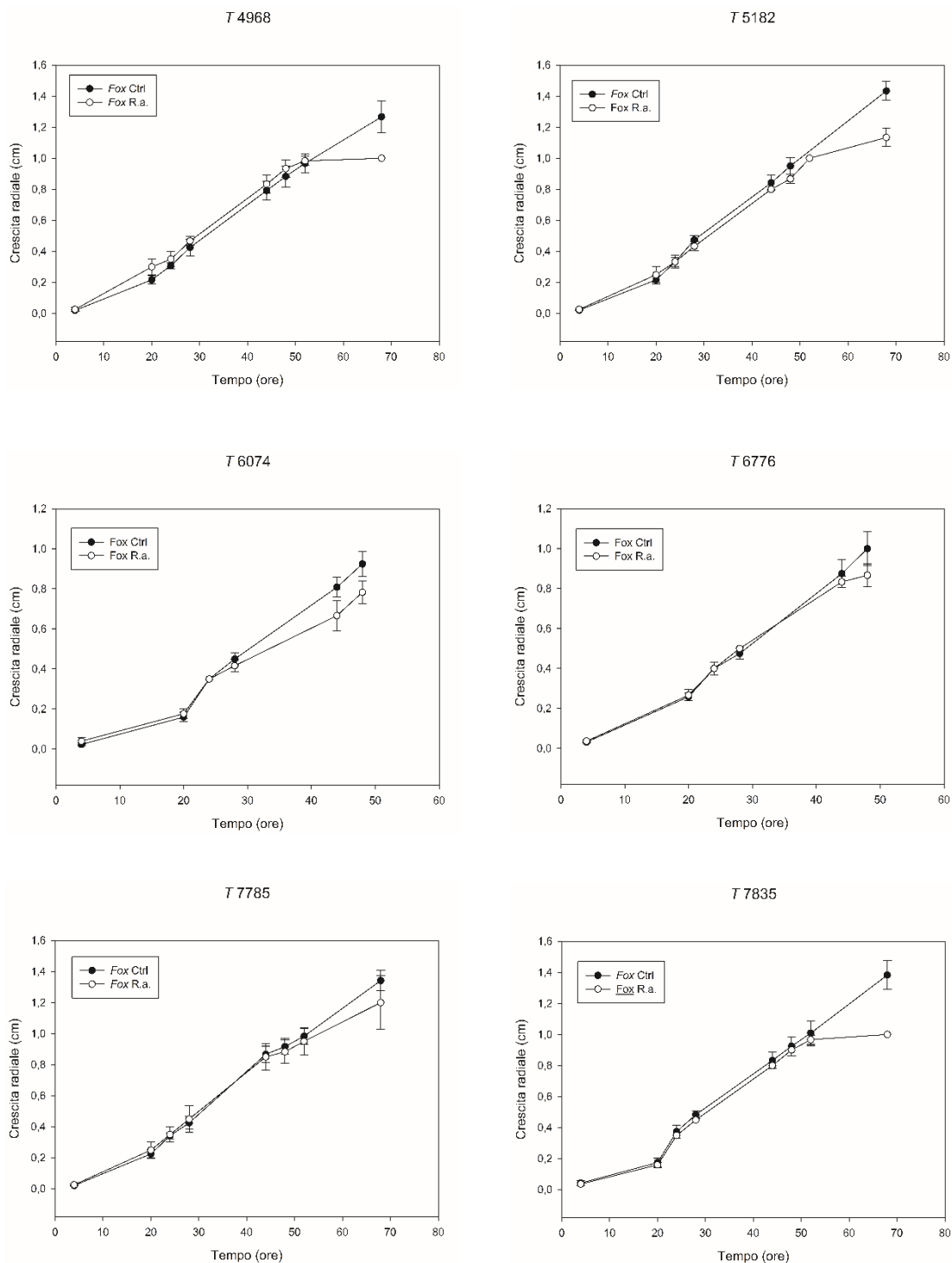
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
T 390	Fox ctrl	0,020	0,973	<0,0001	0,288	0,222
	Fox a	0,019	0,980	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
T 456	Fox ctrl	0,018	0,982	<0,0001	0,095	0,60
	Fox a	0,017	0,961	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
T 1737	Fox ctrl	0,022	0,968	<0,0001	0,810	0,058
	Fox a	0,022	0,979	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
T 2828	Fox ctrl	0,022	0,951	<0,0001	0,781	0,534
	Fox a	0,021	0,959	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
T 4968	Fox ctrl	0,022	0,972	<0,0001	0,0022	
	Fox a	0,017	0,928	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
T 5182	Fox ctrl	0,022	0,979	<0,0001	<0,0001	
	Fox a	0,019	0,973	<0,0001		

		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 5911</i>	Fox ctrl	0,019	0,978	<0,0001	0,138	0,277
	Fox a	0,017	0,947	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 5961</i>	Fox ctrl	0,022	0,947	<0,0001	0,756	0,046
	Fox a	0,022	0,969	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 6074</i>	Fox ctrl	0,021	0,951	<0,0001	0,0027	
	Fox a	0,017	0,952	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 6776</i>	Fox ctrl	0,022	0,965	<0,0001	0,022	
	Fox a	0,019	0,982	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 7785</i>	Fox ctrl	0,021	0,979	<0,0001	0,021	
	Fox a	0,019	0,952	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 7835</i>	Fox ctrl	0,022	0,968	<0,0001	0,002	
	Fox a	0,018	0,936	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 7979</i>	Fox ctrl	0,021	0,971	<0,0001	< 0,0001	
	Fox a	0,017	0,965	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 8001</i>	Fox ctrl	0,023	0,976	<0,0001	0,001	
	Fox a	0,020	0,932	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 8203</i>	Fox ctrl	0,021	0,977	<0,0001	0,001	
	Fox a	0,017	0,939	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 8207</i>	Fox ctrl	0,021	0,971	<0,0001	0,0088	
	Fox a	0,019	0,960	<0,0001		

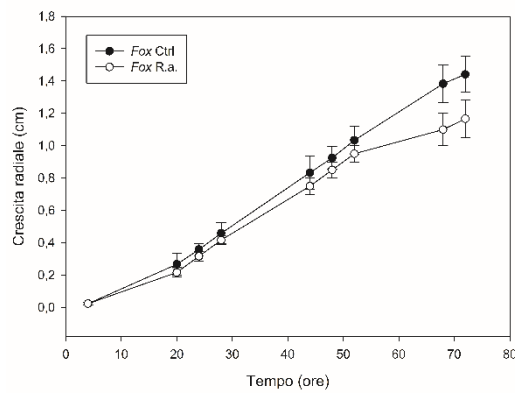
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 8212</i>	Fox ctrl	0,022	0,980	<0,0001	0,171	0,0284
	Fox a	0,021	0,985	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 8214</i>	Fox ctrl	0,021	0,965	<0,0001	0,0005	
	Fox a	0,018	0,969	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 8223</i>	Fox ctrl	0,018	0,947	<0,0001	0,492	0,062
	Fox a	0,020	0,899	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 8227</i>	Fox ctrl	0,021	0,972	<0,0001	0,388	0,806
	Fox a	0,020	0,977	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 8232</i>	Fox ctrl	0,021	0,976	<0,0001	0,264	0,1262
	Fox a	0,020	0,985	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 8233</i>	Fox ctrl	0,021	0,961	<0,0001	0,207	0,284
	Fox a	0,020	0,969	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 8234</i>	Fox ctrl	0,020	0,923	<0,0001	0,376	0,253
	Fox a	0,018	0,892	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 8243</i>	Fox ctrl	0,021	0,980	<0,0001	0,448	0,774
	Fox a	0,021	0,982	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 8486</i>	Fox ctrl	0,022	0,970	<0,0001	0,00054	
	Fox a	0,018	0,953	<0,0001		
		Slope	R ²	P	P slope	P elevation
<i>T 8489</i>	Fox ctrl	0,022	0,983	<0,0001	0,0054	
	Fox a	0,020	0,983	<0,0001		

A titolo esemplificativo nei grafici riportati in figura 4.6, sono mostrate le curve di crescita di *F. oxysporum* vs quegli isolati di *Trichoderma* che hanno avuto un effetto di inibizione significativa della crescita del patogeno ($P \text{ slope} \leq 0.05$).

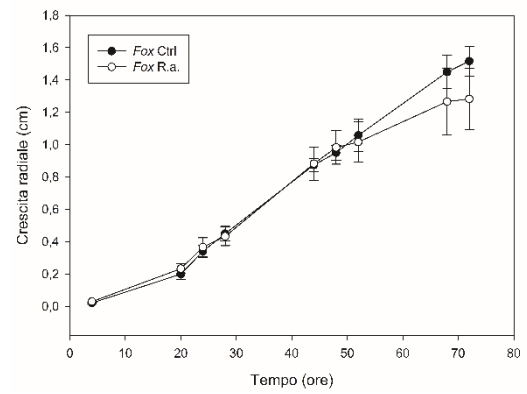
Figura 4.6. Curve di crescita di *F. oxysporum* f. sp. *raphani* su PDA in presenza dei 13 isolati di *Trichoderma* che hanno significativamente ridotto la crescita dl patogeno.



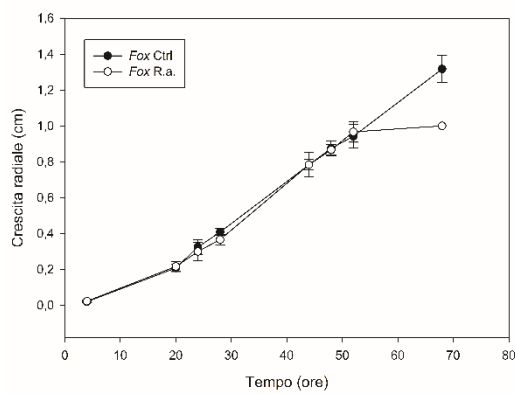
T 7979



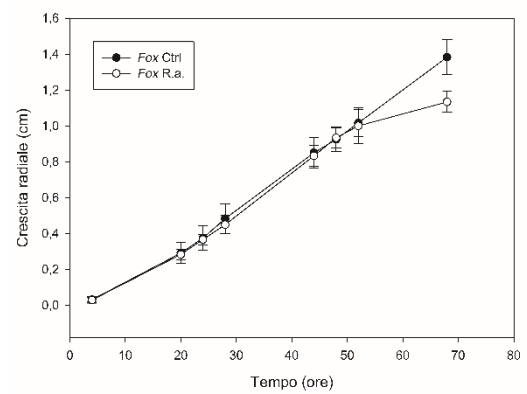
T 8001



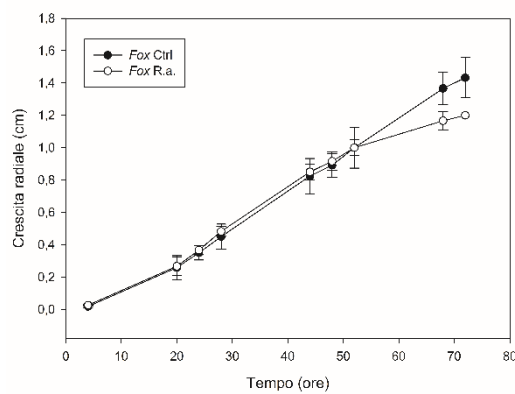
T 8203



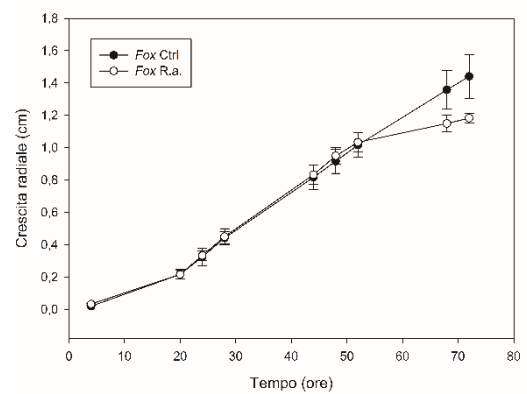
T 8207



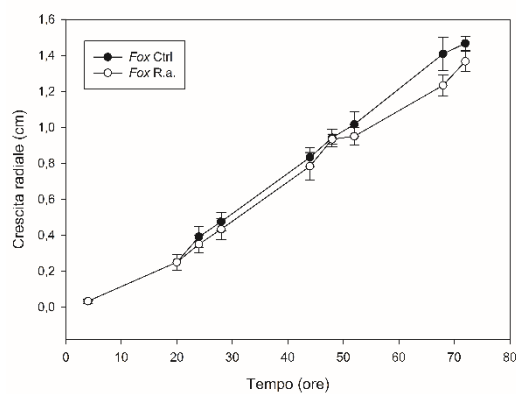
T 8214



T 8486

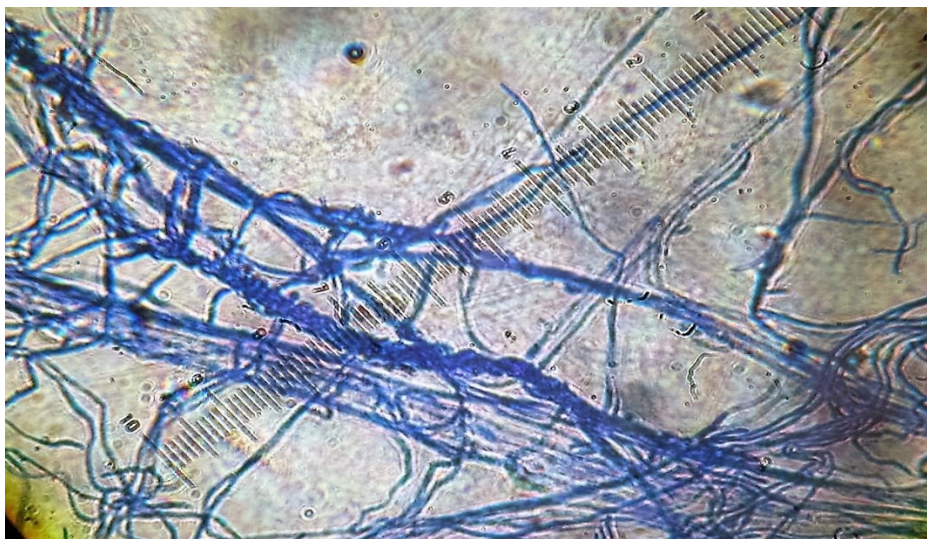


T 8489



Nella prova condotta su substrato WA al fine di valutare la capacità micoparassitica degli isolati di *Trichoderma* T7835 e T8203 – scelti poiché hanno dato risultati positivi in termini di contenimento della tracheofusariosi della rucola (vedi tabella 4.7) è stata riscontrata la formazione di coilings da parte di T7835 nei confronti di *F. oxysporum*, come mostrato in figura 4.7.

Figura 4.7. Formazione di coilings da parte di T7835 nei confronti di *F. oxysporum*.



5. DISCUSSIONE

La tracheofusariosi della rucola, causata dalle ff. spp. *raphani* e *conglutinans* di *Fusarium oxysporum* (Catti et al., 2007), è una malattia che sta interessando areali di produzione sempre maggiori. L'intensificazione dei cicli colturali con elevate densità di semina, l'impoverimento dei suoli e l'applicazione sempre maggiore di concimi di sintesi ha favorito la diffusione di questa malattia (Garibaldi et al., 2004b) che, segnalata per la prima volta in Italia nel 2002 (Garibaldi, 2002) su piante di rucola coltivata e selvatica, è oggi considerata una tra le più dannose per la produzione di questa coltura da foglia. A questo si aggiungono le difficoltà di lotta a *Fusarium oxysporum* causate dall'incredibile capacità di diffusione, di insediamento su ospiti non preferenziali, di differenziamento di forme di resistenza (Griffin, 1981) e di trasmissione per seme (Armstrong and Armstrong, 1948; Katan, 1971) di questo patogeno di origine tellurica.

In passato l'unico modello di lotta era basato sull'eradicazione del patogeno mediante trattamento del terreno, soprattutto attraverso l'impiego di fumiganti come il bromuro di metile, attualmente vietato per la sua azione fortemente impattante sull'ambiente. Tuttavia, l'efficacia dei metodi chimici e fisici possiede dei limiti sia per la metodologia applicativa che per la durevolezza dei risultati ottenuti (Triky-dotan et al., 2007; Triky-Dotan et al., 2009). Oggi la lotta alla tracheofusariosi della rucola in ambiente protetto sembrerebbe basarsi principalmente su un approccio di tipo integrato (Integrated Pest Management o IPM) che prevedrebbe una riduzione dei prodotti di sintesi a cui si possono affiancare prodotti di tipo biologico, contenenti uno o più microrganismi benefici - tra cui funghi appartenenti al genere *Trichoderma* - come principio attivo. L'impiego, infatti, di prodotti biologici per la difesa, sia in una strategia di IPM che in un contesto di controllo biologico, risponderebbe perfettamente alla richiesta della Comunità Europea che, con la direttiva comunitaria 2009/128/CE, recepita dal Decreto legislativo n. 150 del 14 agosto 2012, definisce le misure per un uso sostenibile dei prodotti fitosanitari al fine di ridurre i rischi sulla salute umana, sull'ambiente e sulla biodiversità, promuovendo l'applicazione di metodi non chimici.

Trichoderma è un genere fungino largamente distribuito in tutte le aree geografiche. Numerose specie sono abbondantemente diffuse in molti tipi di suolo, soprattutto quelli ricchi di sostanza organica e tipici di zone a clima fresco o umido. Molti isolati sono caratterizzati da un'elevata attività antagonista, dimostrata sia *in vitro* che *in vivo*, nei

confronti di numerosi patogeni vegetali e di stimolo della crescita di numerose specie vegetali (Lorito et al., 2010). Il successo dell'utilizzo di *Trichoderma* spp. come agente di biocontrollo è imputabile ad una forte attività saprofitaria unita ad una elevata capacità competitiva, dovuta all'abilità di utilizzare efficacemente carbonio e azoto presenti in diversi substrati, alcuni dei quali non utilizzabili da altri funghi; alla rapidità di sviluppo e all'abbondante produzione di conidi; all'adattabilità ad un ampio range di temperature (Shoresh et al., 2010).

Trichoderma spp. agisce utilizzando tutti i meccanismi d'azione noti: micoparassitismo, antibiosi, produzione di enzimi litici, competizione per i siti d'infezione e per i nutrienti, induzione di resistenza a fattori biotici e abiotici (Harman et al., 2004; Harman G. and Shoresh M., 2007; Vinale et al., 2008). Attualmente *Trichoderma* risulta essere il genere fungino più utilizzato come principio attivo di biofitofarmaci e biostimolanti in commercio: oggi più del 60% dei biofungicidi registrati contiene funghi appartenenti a questo genere (Mastouri et al., 2010; Shoresh et al., 2010; Contreras-Cornejo et al., 2014).

In questo contesto, il presente lavoro è stato incentrato sulla ricerca di uno o più isolati di *Trichoderma* spp. in grado di agire come agenti di lotta biologica nei confronti di *F. oxysporum* f. sp. *raphani*, agente causale della tracheofusariosi della rucola.

Al fine di assicurarsi che un microorganismo possa agire come agente di lotta biologica, particolare attenzione deve essere dedicata alla procedura di selezione. Non esiste un modo universalmente corretto per procedere con uno screening; questo dipende dal patogeno bersaglio, dalla coltura, dal sistema di coltivazione e dalle condizioni ambientali (Fravel, 2005; Jensen et al., 2007). In virtù di questo, la sperimentazione ha previsto l'impiego del ceppo 10-223 di *F. oxysporum*, selezionato nel presente lavoro per l'elevata patogenicità espressa sulla cultivar di rucola selvatica Tricia, varietà altamente rappresentativa degli areali di produzione. Poiché la tracheofusariosi della rucola è indotta dalle ff. spp. *raphani* e *conglutinans* (Catti et al., 2007) è stato inizialmente condotto un test differenziale su cavolfiore, ravanella e violacciocca che ha permesso di identificare come f. sp. *raphani* il nostro isolato (Toit and Pelter, 2003). Al fine di porre il patogeno nella migliore condizione di infettare, colonizzare e causare lo sviluppo dei sintomi nell'ospite, sono state condotte diverse prove di inoculazione utilizzando tre concentrazioni di *F. oxysporum* 10-223 su tre differenti substrati: i risultati ottenuti hanno permesso di individuare il terriccio quale migliore mezzo di coltivazione e Fox 10^4 cfu ml^{-1} come concentrazione da utilizzare durante lo screening dei 91 isolati di *Trichoderma*.

Una volta messo a punto il sistema ospite/patogeno, una consistente parte delle successive ricerche è stata incentrata sulla produzione della biomassa e sulla messa a punto del sistema di inoculazione degli antagonisti. I 91 isolati di *Trichoderma* utilizzati sono stati fermentati su crusca e successivamente essiccati in stufa e conservati a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ per circa 6 mesi. Questo metodo di fermentazione è ampiamente utilizzato per la produzione di cellulasi da parte di *Trichoderma reesei*, fermentato su materiale ligneo-cellulosico (Mekala et al., 2008). Il sistema da noi messo a punto ha consentito la produzione della biomassa fungina, e il successivo trasporto sottovuoto, aprendo la possibilità di una produzione dell'inoculo su substrato solido, da applicare in campo aperto e in coltura protetta se sviluppato su scala industriale.

La vera e propria selezione dei 91 isolati di *Trichoderma* spp. in presenza del patogeno e dell'ospite è stata condotta secondo il normale protocollo di allevamento di questa coltura, al fine di mantenere l'ambiente il più possibile simile a quello di coltivazione (Pliego et al., 2011; Whipps and Lumsden, 2001). Le piante sono state allevate in vaso in ambiente protetto a temperatura controllata. Questo ha permesso di ottenere valori di malattia simili a quelli ottenibili in campo. Alla fine della prima procedura di selezione due isolati, T8203 e T6074 hanno dato valori di malattia riconducibili al controllo non inoculato, con piante che hanno mostrato una bassa incidenza di malattia e al tempo stesso un'ottima vigoria. In aggiunta alla capacità di contenere la malattia, è stata evidenziata, infatti, anche la capacità di agire positivamente sulla pianta ospite, in termini di promozione della crescita, caratteristica già evidenziata in altri sistemi colturali quali, ad esempio, petunia e crisantemo trattate con *Trichoderma harzianum* (Chang et al., 1986), o *T. afro-harzianum* su pomodoro (Fiorini et al., 2015). Numerosi sono gli esempi di isolati di *Trichoderma* utilizzati con successo nella lotta biologica alla tracheofusariosi causata da diverse ff. spp. di *F. oxysporum* (Chen et al., 2009 ; Srinivasan et al., 2009; Lorito et al., 2010).

Al fine di non rendere il primo screening troppo stringente e correre il rischio di scartare isolati che potrebbero rilevarsi interessanti ai fini del conseguimento del nostro obiettivo (Jensen et al., 2016), si è deciso di ripetere la prova affiancando ai due isolati sopracitati altri 24 ceppi, individuati all'interno di un raggruppamento considerato ottimale in termini di contenimento della tracheofusariosi e di stimolo della vigoria delle piante. La seconda prova, che ha previsto un numero maggiore di repliche, è stata condotta in condizioni ambientali, in particolare in regimi termici, differenti rispetto alla prima. La

scelta di effettuare una seconda prova in condizioni ambientali diverse deriva da quanto presente in letteratura circa l'effetto dell'ambiente sul patogeno e su eventuali antagonisti. Studi condotti sulla tracheofusariosi del garofano causata da *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* dimostrano che la variazione di radiazione luminosa e la temperatura determinano incidenze di malattia differenti; danni maggiori sono stati registrati a temperature prossime ai 25-26° C, mentre a temperature al di sotto di 18°C le piante si presentavano asintomatiche (Ben-Yephet and Shtienberg, 1994). La risposta di *Trichoderma* a differenti temperature sembra variare da isolato a isolato. Kredics et al. (2003), attraverso uno screening di 360 isolati di *Trichoderma*, hanno dimostrato che ci sono degli intervalli termici all'interno dei quali i diversi isolati riescono a svolgere regolarmente la loro funzione di agenti di biocontrollo. Isolati appartenenti a *T. viride*, *T. aureoviride* e *T. harzianum* riescono a controllare *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* e *Rhizoctonia solani* già a temperature di 10°C, mettendo in atto meccanismi di micoparassitismo.

Questa seconda prova ha confermato, sebbene a livelli inferiori rispetto alla prima (ed in presenza di un'aggressività minore del patogeno) l'isolato T8203 come in grado di controllare la tracheofusariosi della rucola in condizione di temperature inferiori.

La conferma degli effetti benefici dell'isolato T8203 in entrambe le prove apre interessanti prospettive di un suo utilizzo nella lotta biologica a questa malattia su rucola.

6. CONCLUSIONI

L'attività sperimentale condotta al fine di realizzare il presente elaborato ha permesso di:

- Mettere a punto un sistema di fermentazione su substrato solido (SSF) di isolati di *Trichoderma* spp. da utilizzare come inoculanti del terreno in strategie di lotta biologica, potenzialmente applicabile anche su larga scala;
- Lo screening dei 91 isolati fungini ha permesso di individuare, nelle due prove, 3 ceppi in grado di controllare la malattia con T8203 che ha risposto positivamente in entrambe le prove, dimostrandosi potenzialmente efficace nella lotta a *F. oxysporum* f. sp. *raphani*.

Per un possibile sviluppo commerciale dell'isolato T8203 saranno necessarie ulteriori indagini aventi l'obiettivo di:

- Ottimizzare la SSF e valutarne la shelf life;
- studiare in dettaglio i meccanismi d'azione di questo isolato nei confronti del patogeno e della pianta ospite;
- valutare la compatibilità di questo isolato con prodotti commerciali impiegati per la lotta (fungicidi-biofumiganti) nell'ottica della messa a punto di una strategia IPM;
- valutare, nell'ottica di un approccio multitrofico e della costituzione di un consorzio di microrganismi, la possibilità di impiegare l'isolato T8203 insieme ad altri funghi benefici, appartenenti al genere *Trichoderma* o ad altri generi, o in miscela con batteri agenti di biocontrollo e promotori della crescita;
- Verificare l'attività di biostimolo degli isolati selezionati.

7. BIBLIOGRAFIA

- Armstrong G. M., Armstrong J. M., 1948. Nonsusceptible hosts as carriers of wilt Fusaria. *Phytopathology* 38, 808-826.
- Benítez T. et al., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4), pp.249–260.
- Ben-Yephet Y., Reuven M., and Genizi A., 1994. Effects of inoculum depth and density of *Fusarium* wilt in carnations. *Phytopathology* 84: 1393-1398.
- Catti, A. et al., 2007. Analysis of vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* from *Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*. *Journal of Phytopathology*, 155(1), pp.61–64.
- Chang Y-C, Chang Y-C, Baker R, Kleifeld O and Chet I 1986 Increased growth of plants in presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis.* 70, 145–148.
- Chatterjee C., Rai JN., 1974. *Fusarium* wilt of *Eruca vesicaria*—observation on comparative pathogenicity of some strains of *Fusarium oxysporum*. *Indian Phytopathol* 28, 309-311.
- Chen F., Wang M., Zheng Y., Luo J., Chen F., Wang M., Zheng Y., Luo J., Yang X. and Wang X., 2009. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 675-684.
- Chiocchetti, a et al., 1999. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Carnation Tissue by PCR Amplification of Transposon Insertions. *Phytopathology*, 89(12), pp.1169–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18944641>.
- Chugh, J.K. & Wallace, B. a, 2001. Peptaibols: models for ion channels. *Biochemical Society transactions*, 29(Pt 4), pp.565–570.
- Chutrakul, C. et al., 2008. The production and characterisation of trichotoxin peptaibols, by *Trichoderma asperellum*. *Chemistry and Biodiversity*, 5(9), pp.1694–1706.
- Cohen, R. et al., 2002. Horticultural and pathological aspects of *Fusarium* wilt management using grafted melons. *HortScience*, 37(7), pp.1069–1073.
- Contreras-Cornejo, H.A. et al., 2014. *Trichoderma* spp. Improve Growth of Arabidopsis Seedlings Under Salt Stress Through Enhanced Root Development, Osmolite Production, and Na(+) Elimination Through Root Exudates. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 27(6), pp.503–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24502519>.
- Copeman R. J., and Smudja A. M., 1998. Epidemiology of *Fusarium* stem and fruit rot of greenhouse-grown sweet pepper. *Int. Congr. Plant Pathology* 2.4.7.

- Couteaudier Y., Alabouvette C., 1990. Survival and inoculum potential of conidia and chlamydospores of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* in soil. Canadian Journal of Microbiology, 36(8), 551-556.
- Datnoff L.E., Elmer W.H., Huber D.M., eds, 2007. Mineral Nutrition and Plant Disease. American Phytopathological Society St Paul, MN, Press, 233-246.
- Duijff, B.J. et al., 1993. Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of Fusarium wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. Netherlands Journal of Plant Pathology, 99(5-6), pp.277–289.
- Edelstein, M. et al., 2005. Boron and salinity effects on grafted and non-grafted melon plants. Plant and Soil, 269(1-2), pp.273–284.
- Edelstein, M. et al., 1999. Integrated Management of Sudden Wilt in Melons , Caused by *Monosporascus cannonballus* , Using Grafting and Reduced Rates of Methyl Bromide. Plant Disease, 83(12), pp.1142–1145.
- Elmer W. H., 2002a. Influence of inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclamini* and sodium chloride on cyclamen and development of Fusarium wilt. Plant Dis. 86, 389-393.
- Engelhard A. W., 1975. Aster Fusarium wilt: Complete symptom control with an integrated fungicide/NO₃/pH system. (Abstr.) Proc. Am. Phytopath. Soc. 2:62.
- Engelhard A. W., 1979. Control of Fusarium wilt of carnation with an integrated fungicide/(NO₃⁻)-N and systemic fungicide control program. (Abstr.) Proc. Am. Phytopath. Soc. 2, 62.
- Fiorini, L. et al., 2015. *Trichoderma harzianum* T6776 modulates a complex metabolic network to stimulate tomato cv. Micro-Tom growth. Plant and Soil, pp.1–16.
- Fravel, DR., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. Ann. Rev. Phytopathol. 43: 337-359.
- Fry WE (1982) Principles of plant disease management. Academic Press, New York
- Gardiner D. C., Horst R. K., Nelson P. E., 1987. Symptom enhancement of Fusarium wilt of chrysanthemum by high temperatures. Plant Dis. 71, 1106-1109.
- Garibaldi A., Gilardi G., Gullino ML., 2002. First report of *Fusarium oxysporum* on *Eruca vesicaria* and *Diplotaxis* sp. in Europe. Plant Dis 87, 201.
- Garibaldi, A., 2004. Seed transmission of *Fusarium oxysporum* of *Eruca vesicaria* and *Diplotaxis muralis*. Zeitschrift, pp.345–350.
- Griffin G., 1981. Physiology of conidium and chlamydospore germination in Fusarium. In: Nelson P., Toussoum T., Cook R. (eds) Fusarium: diseases, biology, and taxonomy. Pennsylvania State University Press, University Park, Pa, 331–339.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet I., Lorito M., 2004. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol 2: 43-56

- Harman, G.E., Shores, M., 2007. The mechanisms and applications of symbiotic opportunistic plant symbionts. *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management* Part of the series NATO Security through Science Series pp 131-155
- Harman, G.E., 2011. *Trichoderma*-not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica*, 39(2), pp.103–108.
- Howell, C.R., 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87(1), pp.4–10.
- Hughes H.E. and Hanan J.J., 1978. Effect of salinity in water supplies on greenhouse rose [*Rosa hybrida*] production [Nutritional requirements]. agris.fao.org
- Katan, J., 1971. Symptomless carriers of the tomato Fusarium wilt pathogen. *Phytopathology* 61, 1213-1217.
- Katan, T., Shlevin, E. & Katan, J., 1997. Sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on Stem Surfaces of Tomato Plants and Aerial Dissemination of Inoculum. *Phytopathology*, 87(7), pp.712–719.
- Koike, N. et al., 2001. Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungi: Lignification and superoxide generation. *European Journal of Plant Pathology*, 107(5), pp.523–533.
- Kredics, L. et al., 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology and Biotechnology*, 41(1), pp.37–42.
- Jensen, D.F. et al., 2007. Development of a biocontrol agent for plant disease control with special emphasis on the near commercial fungal antagonist *Clonostachys rosea* strain “IK726.” *Australasian Plant Pathology*, 36(2), pp.95–101.
- Jensen, D.F., Karlsson M., Sarrocco, S., Vannacci, G., 2016. Biological control using Microorganisms as an alternative to Disease Resistance. *Plant Pathogen Resistance Biotechnology*. (waiting to be published)
- Jones J. P., Woltz S. S., 1969. Fusarium wilt race 2 of tomato: Calcium, pH and micronutrient effect on disease development. *Plant Dis. Rep.* 53, 276-279.
- Liu, W.C. et al., 2014. Application of *Pantoea agglomerans* strain Z01 to control Fusarium wilt and its effect on the quality parameters of rockets. *Annals of Microbiology*, 64(3), pp.1443–1446.
- Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E. & Monte, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annu Rev Phytopathol* 48, 395–417.
- Lotan, T. & Fluhr, R., 1990. Xylanase, a novel elicitor of pathogenesis-related proteins in tobacco, uses a non-ethylene pathway for induction. *Plant physiology*, 93(2), pp.811–817.

- Lu P., Gilardi G., Gullino M. L., Garibaldi A., 2010. Biofumigation with Brassica plants and its effect on the inoculum potential of *Fusarium* yellow of Brassica crops. *Eur. J. Plant Pathol.* 126, 387-402.
- Manulis S., Kogan N., Valinsky L., Dror O., and Kleitman F., 1999. Detection of plant pathogens in flowers by the PCR technique. *Acta Hortic.* 482, 117-122.
- Marchant R., 1965. Fine structure and spore germination in *Fusarium culmorum*. *Ann. Bot., N.S.* 30, 441-445.
- Martinez, C., 2001. Salicylic Acid and Ethylene Pathways Are Differentially Activated in Melon Cotyledons by Active or Heat-Denatured Cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiology*, 127(1), pp.334–344. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.127.1.334>.
- Mastouri, F., Björkman, T. & Harman, G.E., 2010. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, 100(11), pp.1213–1221.
- Matheron, M.E. et al., 2005. Effect of Planting Date, Cultivar, and Stage of Plant Development on Incidence of *Fusarium* Wilt of Lettuce in Desert Production Fields. *Plant Disease*, 89(6), pp.565–570.
- Mekala, N.K. et al., 2008. Cellulase production under solid-State fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: Statistical optimization of process parameters. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151(2-3), pp.122–131.
- Mohamed, H.A.L.A. & Haggag, W.M., 2006. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(2), pp.181–191.
- Pietersen C. M. J., and Van Loon L. C., 2007. Signalling cascades involved in induced resistance. Pages 65-88 in: *Induced resistance for Plant Defence: A Sustainable Approach to Crop Protection*. D. Walters, A. Newton and G. Lyon, eds. Blackwell, Oxford.
- Pliego C., Ramos C., de Vicente A., Cazorla FM., 2011. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant and Soil* 340: 505-520.
- Qi, W. & Zhao, L., 2013. Study of the siderophore-producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress. *Journal of Basic Microbiology*, 53(4), pp.355–364.
- Rebuffat, S. et al., 2000. Two unprecedented natural aib-peptides with the (Xaa-Yaa-Aib-Pro) motif and an unusual C-terminus: Structures, membrane-modifying and antibacterial properties of pseudokonins KL III and KL VI from the fungus *Trichoderma pseudokoningii*. *Journal of Peptide Science*, 6(10), pp.519–533.
- Scott, J. et al., 2005. Effect of Temperature on Severity of *Fusarium* Wilt of Lettuce Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Plant Disease*, 94(19), pp.13–17.

- Shabala, S. & Cuin, T.A., 2008. Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum*, 133(4), pp.651–669.
- Sherameti, I., Venus, Y., et al., 2008. PYK10, a β -glucosidase located in the endoplasmatic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *Plant Journal*, 54(3), pp.428–439.
- Sherameti, I., Tripathi, S., et al., 2008. The root-colonizing endophyte *Piriformospora indica* confers drought tolerance in *Arabidopsis* by stimulating the expression of drought stress-related genes in leaves. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 21(6), pp.799–807.
- Shoresh, M., Yedidia, I. & Chet, I., 2005. Involvement of Jasmonic Acid/Ethylene Signaling Pathway in the Systemic Resistance Induced in Cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, 95(1), pp.76–84.
- Shoresh, M., Harman, G. E. and Mastouri, F., 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathol* 48, 21-43.
- Sigillo L., Senape V., Serratore G., Bravi R., 2012. A standadized method to evaluate the resistance tu *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in lettuce. *Journal of Plant Pathology* . Dec2012 Supplement, Vol. 94 Issue 4, pS4.80-S4.80. 1/3p.
- Srinivasan, K. et al., 2009. Bacterial antagonists from used rockwool soilless substrates suppress *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Plant Pathology*, 91(1), pp.147–154.
- Stein, E. et al., 2008. Systemic resistance in *Arabidopsis* conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. *Plant and Cell Physiology*, 49(11), pp.1747–1751.
- Toit, L.J., 2003. Wilt of Radish Caused by *Fusarium oxysporum* f . sp . *raphani* in Washington State Plant Health Progress Plant Health Progress. Quality, (May), pp.4–6.
- Traka-Mavrona E., Koutsika-Sotiriou M., and Pritsa T., 2000. Response of squash (*Cucurbita* spp.) as rootstok for melon (*Cucumis melo* L.). *Sci. Hortic.* 83, 353-362.
- Triky-Dotan, S. et al., 2007. Generation and Dissipation of Methyl Isothiocyanate in Soils Following Metam Sodium Fumigation : Impact on *Verticillium* Control and Potato Yield. *Plant Disease*, 91(5), pp.497–503.
- Triky-Dotan, S. et al., 2009. Accelerated degradation of metam-sodium in soil and consequences for root-disease management. *Phytopathology*, 99(4), pp.362–368.
- Vinale, F. et al., 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), pp.1–10.
- Walters, D. et al., 2005. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology*, 95(16), pp.1368–1373.

- Walters, D., Newton, a & Lyon, G., 2007. Induced Resistance for Plant Defence,
- Whipps, J.M., 1997. Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Advances in Botanical Research* 26, 1-134.
- Whipps JM., Lumsden RD., 2001. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In TM Butt, C Jackson, N Magan, eds, *Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential*. CABI, Wallingford, pp 9-22.
- Woltz, S.S. & Engelhard, A.W., 1972. Fusarium wilt of chrysanthemum effect of nitrogen source and lime on disease development. *Phytopathology*, 63, pp.155–157.
- Woo, S.L. et al., 2006. The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and Plants. *Phytopathology*, 96(2), pp.181–185.
- Yedidia, I. & Benhamou, N., 1999. Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. 65(3), pp.1061–1070.
- Yedidia, I. et al., 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentration and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil*, 235, pp.235–242.
- <http://www.venetoagricoltura.org/upload/pubblicazioni/E51.pdf>
- <http://www.freshplaza.it/article/44942/Il-valore-del-settore-della-rucola-in-Italia-e-stimato-in-30-40-milioni-di-euro-solo-per-lexport>
- <http://www.sar.sardegna.it/servizi/agro/idrosuoli.asp>

Allegato 1 – P15

INRAN – Sezione Battipaglia
Laboratorio di Analisi Fitopatologiche



P. Int.	P15
---------	-----

PREPARAZIONE DI UNA SOSPENSIONE CONIDICA

Scopo: preparazione di una sospensione conidica a concentrazione nota
Campo di applicazione: analisi micologiche

MATERIALI:

- colonia fungina cresciuta su substrato solido
- acqua sterile
- becco bunsen
- pipette graduate monouso da 10 ml
- cilindro
- anse sterili.

METODI: quando la colonia ha differenziato i conidi si procede come segue:

1. preparare sotto cappa tutto l'occorrente per effettuare la sospensione;
2. aggiungere in piastra 20 ml di acqua sterile;
3. grattare con un'ansa sterile la superficie della colonia;
4. lasciare riposare per 10-15';
5. agitare con l'ansa, prelevare una piccola quantità di sospensione e disporla sulla camera contaglobuli di Buerker;
6. adagiare sulla goccia il coprioggetto e procedere alla conta dei conidi con il microscopio;
7. contare il numero di conidi presenti in almeno 8 quadratini
8. calcolare la media degli 8 quadratini
9. applicare la formula seguente

$$\text{media dei quadratini} \times 250.000 = n^{\circ} \text{ dei conidi/ml}$$
10. diluire la sospensione fino a raggiungere la concentrazione ottimale, considerando la concentrazione conidica valutata al microscopio e quella voluta
11. in genere, la concentrazione conidica indicata per le prove di patogenicità e resistenza è 1×10^6 cfu/ml. Bisogna quindi diluire la sospensione fino a ottenere mediamente 4 – 5 conidi/quadrato

ACCORGIMENTI: cambiare ansa a ogni passaggio per non falsare la valutazione della concentrazione; manipolare la piastra e utilizzare l'attrezzatura sotto cappa.

Approvato dal responsabile qualità. Data 26/01/2011

Firma

Allegato 2 – P36



1

P. Int. P36

RESISTENZA ALLA TRACHEOFUSARIOSI DELLA RUCOLA

Scopo: valutazione del carattere di resistenza alla fusariosi, valutazione della patogenicità di isolati di fusarium da seme di rucola

Campo di applicazione: caratterizzazione fisiologica della rucola,

Modulistica: per le registrazioni impiegare il modulo "test di resistenza"

"certificato diagnosi"

MaterialiMateriali generici

- polistiroli da 190 fori (1 polistirolo è sufficiente per la semina di 10 campioni)
- Vermiculite
- Polistiroli da 60 fori (1 polistirolo è sufficiente per saggiare 3 campioni)
- terriccio per semine
- sabbia SATAF

Cepi fungini impiegati

Fusarium da rucola ceppi: 07306AL1 oppure 09407PAL1 depositati presso il Laboratorio di Analisi Fitopatologiche dell' ENSE di Battiaglia

Numero di piante da testare: almeno 24 per campione. Cinque semi per varietà vengono lasciati non inoculati

MetodiPreparazione delle piante

- Effettuare la semina almeno due settimane prima della data prevista per l'inoculazione. Disporre i semi di rucola in vermiculite sterile in contenitori di polistirolo da 190 fori. In ogni foro vengono posti 2-3 semi. Le piantine devono essere allevate in condizioni controllate, in serra o in camera climatica, fissando la temperatura ambientale tra i 20 e 24°C e il periodo di illuminazione a circa 12 ore ed effettuando irrigazioni regolari.

Preparazione del patogeno

- L'inoculo viene preparato in condizioni di sterilità. Il giorno stesso in cui viene effettuata la semina delle piantine, riprendere i patogeni dalla coltura madre, trasferendoli su PDA. Allevarli a 23 °C \pm 2 fino a quando il micelio fungino non ha completamente ricoperto la superficie della piastra e ha differenziato numerosi conidi. Il tempo necessario affinché il *Fusarium* raggiunga questo grado di accrescimento si aggira intorno ai 15 giorni.

Preparazione dell'inoculo

- Preparare una sospensione di 1×10^5 conidi/ml in acqua distillata sterile (P. int.: P15). Per ottenere questa concentrazione versare 20 ml di acqua distillata sterile in piastra, attendere 10 – 15 minuti e grattare la superficie dell'agar con un'ansa sterile. Misurare la concentrazione della sospensione ottenuta con una camera di Thoma ed effettuare le opportune diluizioni fino ad ottenere il valore desiderato. In genere il volume totale di acqua che bisogna aggiungere è circa 100 ml per ogni piastra della coltura. Cinque piantine per campione vengono trattate sostituendo acqua sterile alla sospensione conidica.
- Occorre precisare che da questo momento in poi non vengono più mantenute rigorose condizioni di sterilità sebbene tutte le operazioni vengano preferibilmente condotte impiegando materiali sterilizzati, ossia esenti da contaminazioni iniziali.

INRAN –Sezione Battipaglia
Laboratorio Analisi Fitopatologiche

2

Inoculazione

- Contenitori di polistirolo da 60 fori vengono riempiti con una miscela sabbia in rapporto 1:1. Il terriccio è stato preventivamente pastorizzato mediante trattamento in stufa a 70°C per 24. Viene utilizzata sabbia SATAF.
- Alla comparsa della prima - seconda foglia vera (a circa 20 giorni dalla semina), le piantine da saggiare e i controlli vengono inoculati. L'inoculazione viene effettuata prelevando le piantine dalla vermiculite e immergendo le radici ferite (si effettua un taglio con le forbici), per cinque minuti nella sospensione dell'inoculo. Si effettua quindi il trapianto nei polistiroli
- **IMPORTANTE:** irrigare immediatamente dopo il trapianto

Allevamento piante e sviluppo malattia

- In cella climatica o in serra, impostare le condizioni ambientali per lo sviluppo della malattia a 25 °C \pm 2 e 12 ore di luce. Non sono richieste particolari condizioni di umidità. Irrigazioni regolari.

Lettura dei risultati

- A partire dai 10 - 15 giorni successivi all'inoculazione, il rilevamento della malattia viene effettuato mediante osservazione visiva dei sintomi che si manifestano con appassimenti della parte aerea e ingiallimento delle foglie. Naturalmente le condizioni dei campioni inoculati vanno confrontate con quelle dei testimoni non inoculati e delle varietà di riferimento. A cadenza settimanale, per almeno un mese, i rilievi della malattia vanno ripetuti. Il riconoscimento dei sintomi non è sempre agevole. Le fusariosi sono infatti malattie vascolari che generano lo sviluppo di sintomatologie spesso aspecifiche. Nei casi dubbi sarebbe pertanto opportuno effettuare isolamenti su substrato solido impiegando le metodologie classiche e procedendo al riconoscimento delle caratteristiche dei funghi dall'aspetto macroscopico del micelio eventualmente sviluppatosi in piastra.
- In condizioni ottimali, il campione risulta omogeneo nello sviluppo dei sintomi. Ove questo non avvenisse, si considerano sensibili, varietà che presentano più del 10% di piante malate

Referenze

- EUROPEAN UNION. COMMUNITY PLANT VARIETY OFFICE. PROTOCOL FOR DISTINCTNESS, UNIFORMITY AND STABILITY TESTS. *Lycopersicon lycopersicum* L. Karsten ex. Farw. TOMATO. Adopted on 15/11/2001. CPVO-TP/44/2 Final. English. Date: 15/11/2001

Approvato dal responsabile qualità. Data 06/06/2011

Firma



8. RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare il Prof. Vannacci per la sua disponibilità, il suo aiuto e per l'estrema professionalità e serenità che riesce a trasmettere, perché ha reso il cantinone una Famiglia prima ancora di un Dipartimento (caro Gianni mi hai regalato un'esperienza indimenticabile da cui prenderò esempio per tutta la mia vita). Ringrazio la Dott.ssa Sarrocco per l'aiuto e l'amicizia profonda che mi ha donato, per la sua bontà d'animo e in alcuni casi, quasi sempre, le sue azioni caritatevoli nei miei confronti (Sabrina ti voglio dire Grazie Mille Tutor perchè non so come esprimere la mia gratitudine ed il mio affetto per la persona che Sei e quello che hai fatto per me).

Ringrazio il Prof. Malorgio per la disponibilità, il sostegno e i consigli dati durante la stesura della tesi e nella carriera universitaria.

Un abbraccio caloroso va a Rosaria, Riccardo, Susanna, Grazia, Lisa, Antonio, Stefania, Giulia, Daniele, Sara, Federico e tutti coloro che hanno partecipato alla vita del Cantinone.

Ringrazio la Dott.ssa Sigillo che mi ha accolto a braccia aperte nel suo Laboratorio Fitopatologico permettendomi di conoscere la splendida realtà del CRA-SCS di Battipaglia e di accrescere il mio bagaglio culturale. Oriana sei una persona meravigliosa e con un cuore enorme, se non fosse stato per te, tutto il lavoro che è stato discusso oggi non sarebbe stato possibile. Ringrazio a saluto con affetto i miei colleghi di Battipaglia Veronica, Giovanna, Gennaro, Liliana, la Signora Antonietta e la Dott.ssa Romana Bravi direttrice del CRA-SCS di Battipaglia

Ai coinquilini "notarini e non" Andrea, Eugenio, Nicolò, Rosa e Davide con i quali ho creato un legame che non si spezzerà mai, con cui ho condiviso pranzi, cene, caffè "miscela speciale Eugenio", momenti di sconforto ma soprattutto gioie e partite a Risiko, voglio dedicare un abbraccio speciale con la collaborazione di Rocky.

Un ringraziamento speciale va ai miei amici Zio Vittorio e Paolo Balengo per essermi stati vicino nei momenti del bisogno e per le belle esperienze condivise sorseggiando una birra

Alla mia famiglia: a voi vorrei dire che siete sempre nei miei pensieri.

Lo so, mi sono allontanato già da 10 anni da casa e forse non mi sentite così presente come vorrei essere ma l'ho fatto solo per diventare una persona in grado di poter affrontare la vita a testa alta, con delle competenze che un domani non troppo lontano mi consentano di vivere al meglio, proprio come voi avreste sempre voluto. Per questo vi

ringrazio, perché è merito vostro se oggi ho raggiunto questo obiettivo così importante e vorrei che voi vi sentiste fieri di me, perché io sono enormemente fiero di voi. A mio fratello Luca va tutta la mia stima e ammirazione per la persona competente e preparata che è diventata, per la dedizione e il sacrificio che mette in tutto quello che fa e per l'appoggio e l'amore che ha sempre dato a me e alla famiglia.

Per mio fratello Cristian desidero ogni bene; che riesca a percorrere la sua strada serenamente e senza timore, perché la gioventù va vissuta a pieno e se ci sono ostacoli nella vita che credi di non superare, devi ricordarti sempre che al tuo fianco ci siamo noi che ti appoggeremo sempre.

A Miriam, il mio Amore e la mia Gioia, voglio dire che sono felice di condividere con te tutto questo e spero vivamente che tu voglia esser parte della mia vita per sempre.

Non prometto ovviamente di non farti arrabbiare, ma questo credo tu lo sappia già.

Grazie per tutto quello che fai per me e per l'amore che mi dai.